

Aus dem medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Th. M. Gress  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg



## **Funktionelle Charakterisierung des Trefoil Factor 1 im Pankreaskarzinom**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich der Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
Manuela Miriam Schmidt aus Kassel  
Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am  
26.07.2011.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. M. Rothmund
Referent:	PD Dr. M. Buchholz
1. Korreferent:	Prof. Dr. A. Brehm

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Das Pankreaskarzinom	1
1.2	Die Familie der Trefoil Faktoren	5
1.3	Trefoil Factor 1	7
1.4	Zielsetzung der Arbeit	13
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>14</b>
2.1	Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien	14
2.2	Zellkultur	16
2.3	Genregulation adhärenter Zellen durch Transfektion	19
2.4	Nukleinsäureanalytische und molekularbiologische Methoden	25
2.5	Proteinanalytische Methoden	28
2.6	Funktionelle Versuche	33
2.7	Statistische Auswertung	39
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>40</b>
3.1	Expression von TFF1 in verschiedenen Zellkulturlinien	40
3.2	Rekombinante Überexpression von TFF1	42
3.3	Effekte transienter TFF1-Überexpression in HEK-293	47
3.4	Effekte von TFF1 auf das Verhalten stabil transfizierter PaTu 8988t-Zellen	52
3.5	Genesilencing	56
3.6	Effekte der Repression von TFF1 in PaTu 8988s-Zellen	57

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>61</b>
4.1	Einfluss von TFF1 auf das Verhalten verschiedener Zelllinien <i>in vitro</i>	61
4.2	Schlussfolgerung	66
4.3	Ausblick	67
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	<b>86</b>
8.1	Abbildungsverzeichnis	86
8.2	Tabellenverzeichnis	87
8.3	Abkürzungsverzeichnis	88
8.4	Verzeichnis akademischer Lehrer	94
8.5	Danksagung	95

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Pankreaskarzinom

### 1.1.1 Allgemeines

Krebserkrankungen sind eine der führenden Todesursachen in der westlichen Welt. Unter ihnen nimmt das Pankreaskarzinom eine besondere Stellung ein: In Deutschland entfallen nur ca. 3 % der Krebsneuerkrankungen auf das Pankreaskarzinom, jedoch ist es verantwortlich für 6 - 7 % aller Krebstodesfälle [84].

Die Prognose ist infaust, vor allem auch auf Grund der Tatsache, dass die Krankheit mangels Frühsymptomen in der Regel erst spät entdeckt wird. Die 5-Jahres-Überlebensrate am Pankreaskarzinom Erkrankter liegt in Deutschland bei 6 – 8 %; bemerkenswert ist, dass sich an dieser Tatsache in den vergangenen 20 Jahren im Gegensatz zu vielen anderen Krebserkrankungen nur wenig geändert hat [85].

Therapeutisch ist der einzig kurative Ansatz die Operation; jedoch kommt diese nur für 15 – 20 % der Patienten in Betracht. Weiterhin stehen die Chemo- oder Radiochemotherapie für palliative Ansätze zur Verfügung [59, 61, 70].

Prädisponierend für das Pankreaskarzinom sind eine positive Familienanamnese sowie die hereditäre und die nicht-hereditäre Pankreatitis. Hier konnten einige Keimbahnmutationen identifiziert werden, die das Erkrankungsrisiko erhöhen [94, 80, 50, 62, 98]. Ebenso scheinen Nikotinkonsum und gewisse Ernährungsgewohnheiten eine Rolle zu spielen [51, 68, 67, 113].

### 1.1.2 Molekularpathologie

Der Begriff Pankreaskarzinom umfasst mehrere histologisch unterschiedliche Entitäten, wobei es sich jedoch in über 85 % der Fälle um duktale Adenokarzinome handelt. Die folgenden Ausführungen beziehen sich daher in erster Linie auf diese Tumorentität [60].

In den letzten Jahren entstand die allgemein akzeptierte Auffassung, dass sich das duktale Adenokarzinom aus Vorläuferläsionen, den so genannten Pankreatischen Intraepithelialen Neoplasien (PanIN), entwickelt. Diese umfassen mehrere Grade der Dysplasie, die im Laufe der Zeit durch Anhäufung verschiedener genetischer Mutationen entstehen und schließlich in ein Karzinom übergehen können. Als weitere Vorläuferläsionen des dukталen Adenokarzinoms werden auch die intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN) und die muzinös zystische Neoplasie (MCN) diskutiert [34, 99].

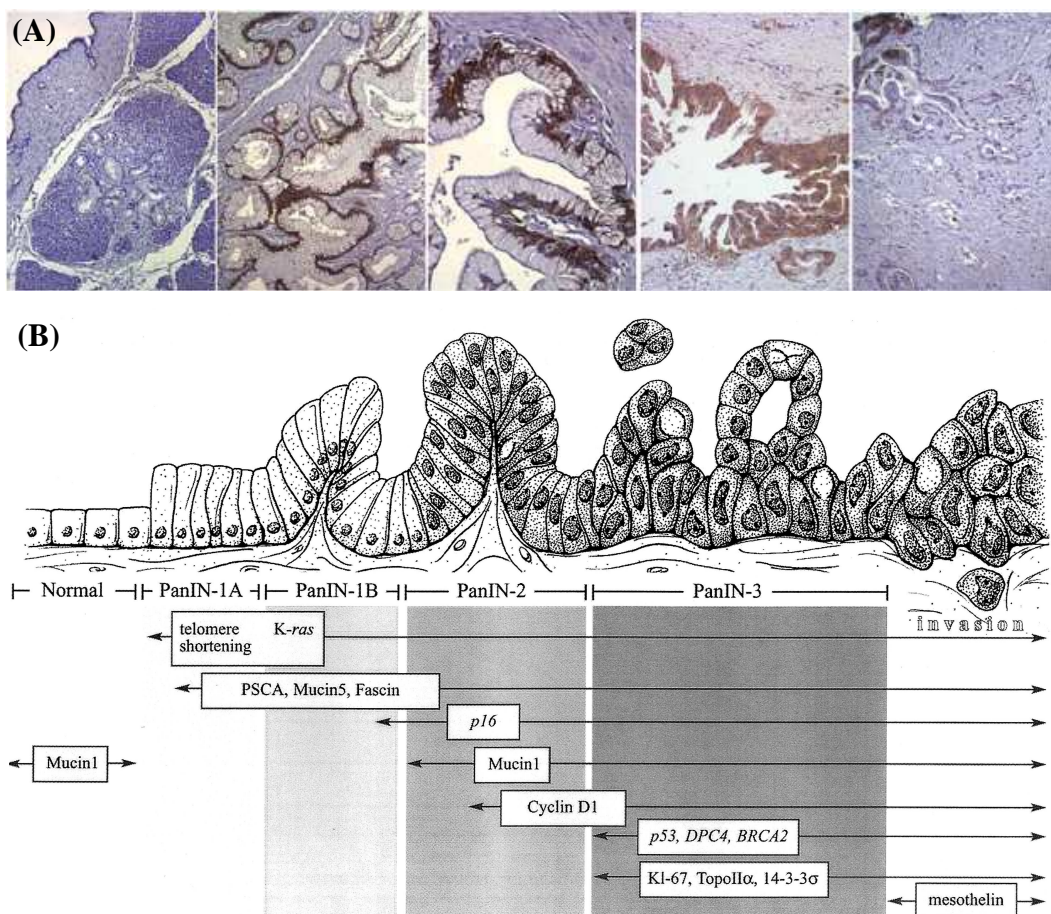
Nicht ganz klar ist bisher, welche Zelle die eigentliche Ursprungszelle des Karzinoms darstellt. Ursprünglich legte die morphologische Ähnlichkeit der Tumorzelle eine Abstammung von dukталen Epithelzellen nahe. Inzwischen werden aber auch Azinuszellen, zentroazinäre Zellen oder sogar endokrine Zellen in Betracht gezogen [60].

Die Mutationen, die für Dysplasien bis hin zum Karzinom verantwortlich sind, sind vielfältig und auch nicht immer konstant; einige Mutationen aus früheren Stadien scheinen später wieder verloren zu gehen. Eine der ersten und auch häufigsten jedoch ist die Aktivierung des Onkogens K-ras, das schließlich in über 90 % der Karzinome zu finden ist. Im weiteren Verlauf kommen Mutationen in Tumorsuppressorgenen hinzu. Hierzu gehören zunächst das Gen CDKN2A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) bzw. P16, welches eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielt. Finden sich auch Mutationen von SMAD4, welches intrazelluläre Signale des TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ )-Rezeptors übermittelt, und des p53-Proteins, handelt es sich meist schon um eine fortgeschrittene Dysplasie (PanIN 3) [38, 35, 33, 32, 11, 93, 60, 9].

Weniger häufig kommen Mutationen des BRCA2 (BReast CAncer 2)-Gens vor. Diese spielen jedoch bei der Entstehung des familiären Pankreaskarzinoms eine größere Rolle, da sie meist als Keimbahnmutation auftreten [25]. In einem ähnlichen Zusammenhang stehen Mutationen des STK11-Gens, welches für eine Serin/Threonin-Kinase kodiert, die die Zellpolarität reguliert. Keimbahnmutationen

dieses Gens finden sich bei Patienten mit Peutz-Jeghers-Syndrom, die ein erheblich höheres Risiko für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms aufweisen [23].

Als durch diese Mutationen betroffene Signalwege konnten unter anderem die Regulation des G1/S-Phase-Übergangs und der Hedgehog-Signalweg identifiziert werden. Der Hedgehog-Signalweg spielt eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung des Pankreas und scheint im Pankreaskarzinom reaktiviert zu werden [38, 6].



**Abbildung 1: Entstehung des Pankreaskarzinoms über die Vorstufen der Pankreatischen Intraepithelialen Neplasie**

- (A) Histologische Beispiele; von links nach rechts: unverändertes Pankreasgewebe, PanIN1, 2, 3 und Duktales Adenokarzinom; mit freundlicher Genehmigung aus [60].
- (B) Schematische Darstellung häufiger Mutationen und ihre zeitliche Abfolge; PSCA = Prostate Stem Cell Antigen; DPC4 = SMAD4; mit freundlicher Genehmigung aus [53].

Im Zusammenhang mit der Invasivität und dem Metastasierungspotential der Tumorzellen spielen Interaktionen mit der Umgebung eine große Rolle. Ein Merkmal des duktales Adenokarzinoms des Pankreas ist die ausgeprägte desmoplastische Stromareaktion des angrenzenden Gewebes. Die Interaktion dieses aus spezifischen Bindegewebszellen (Pancreatic Stellate Cells, PSCs), Endothelzellen und verschiedenen Entzündungszellen zusammengesetzten Stromas mit den eigentlichen Tumorzellen, hat in den letzten Jahren an größerer Bedeutung in der Forschung gewonnen. So scheinen die Tumorzellen z.B. die Produktion extrazellulärer Matrix über FGF-2 (Fibroblastic Growth Factor 2) und TGF- $\beta$  zu stimulieren. Auch hier spielt wieder der Hedgehog-Signalweg eine Rolle. Des Weiteren findet sich eine starke Expression von Matrixmetalloproteinasen und Plasminogenaktivatoren an der Grenze von Stroma zu Tumor [2, 3, 10, 18, 46, 6, 100, 119].

Diese ausgeprägte desmoplastische Reaktion erscheint auf den ersten Blick für den Tumor ungünstig zu sein. Das feste Bindegewebe ermöglicht zum Beispiel nur eine spärliche Vaskularisation des Tumorgewebes. Andererseits erschwert diese Gefäßarmut jedoch den Zugriff anderer Körperzellen auf die Tumorzellen. Die aus dem gleichen Grund entstehende Hypoxie scheint dem Tumor außerdem eine höhere Aggressivität zu verleihen. Einhergehend hiermit gewinnen die Tumorzellen einen großen Anteil ihrer Energie durch anaerobe Glykolyse. Dieses als Warburg-Effekt bezeichnete Phänomen ist, unabhängig von der jeweils verfügbaren Sauerstoffversorgung, auch für andere maligne Tumore beschrieben. Ein Resultat der Desmoplasie ist darüber hinaus möglicherweise, dass die Tumorzellen schlechter durch Chemotherapeutika angegriffen werden können [65, 112, 69].

Ein weiteres Phänomen, welches mit einer gesteigerten Fähigkeit zu metastasieren und invasives Wachstum zu zeigen einhergeht, ist die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT). Während dieses normalerweise in der Embryonalentwicklung wichtigen Prozesses erlangen ausdifferenzierte Epithelzellen durch Lockerung der Zell-Zell-Kontakte die Fähigkeit zu migrieren. Dieser Verlust der Zell-Zell-



Kontakte führt nicht zur Apoptose. Charakteristisch für die EMT ist ein so genannter Cadherin-Switch: Das normalerweise von Epithelzellen exprimierte E-Cadherin wird reprimiert und durch N-Cadherin ersetzt. Reguliert wird dieser Vorgang unter anderem von TGF- $\beta$ , HGF (Hepatocyte Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), IGF (Insulin-like Growth Factor) und FGF. Im duktaalen Adenokarzinom konnte eine reduzierte E-Cadherin-Expression mit fortgeschrittenen Tumorstadien in Verbindung gebracht werden [63, 64, 13, 39].

## 1.2 Die Familie der Trefoil Faktoren

Die Familie der humanen Trefoil Faktoren (TFFs) umfasst bislang drei 7 – 12 kDa große proteasestabile Proteine: TFF1, auch hpS2 (human breast cancer associated peptide 2) oder BCEI (**B**reast **C**ancer **E**strogen **I**nducible), TFF2, auch SP (**S**pasmolytic **P**olypeptide) und TFF3, auch ITF (**I**ntestinal **T**refoil **F**actor). Es handelt sich um sezernierte Proteine, die fast immer im Zusammenhang mit Schleimhäuten gefunden werden können, hauptsächlich jedoch im Gastrointestinaltrakt. Ihre Verteilung ist allerdings nicht gleichmäßig. So wird TFF1 vorwiegend von den oberflächlichen Epithelzellen des Magens produziert, TFF2 von den schleimproduzierenden Nebenzellen im Magen und den Brunner-Drüsen des Dünndarms und TFF3 vor allem von Becherzellen entlang des gesamten Dün- und Dickdarms. Darüber hinaus lassen sich TFFs auch im Gehirn und in der Blutbahn oder als Immunmodulatoren nachweisen [52, 30, 76, 44, 74].

Die strukturelle Gemeinsamkeit der TFFs besteht in der so genannten Trefoil- oder P-Domäne. Die Trefoil-Domäne wurde ursprünglich als eine hochkonservierte Sequenz von 38 - 39 Aminosäureresten beschrieben, darunter 6 Cystein-Reste. Diese bilden Disulphid-Brücken in einer 1-5, 2-4 und 3-6 Konfiguration aus und so entsteht eine charakteristische dreiböigige Struktur, die an die Form eines Kleeblatts erinnert [106]. Inzwischen wurde der Begriff auf eine Sequenz von 42 - 43 Aminosäureresten ausgeweitet [107]. TFF2 besitzt zwei solcher Trefoil-Domänen, TFF1 und TFF3 nur eine. Zusätzlich verfügen die Letztgenannten allerdings noch über einen freien Cysteinrest nahe des C-Terminus, welcher zur Ausbildung von

Homo- und Heterodimeren befähigt [58, 14, 66]. Einen ausführlichen Überblick über die chemische Struktur der TFFs und mögliche funktionelle Implikationen geben Thim et al. [105].

Die physiologische Funktion der Trefoil Faktoren besteht aus einer zentralen Rolle in der Restitution der gastrointestinalen Mukosa nach Schädigungen unterschiedlichster Genese [116, 95, 31]. Es konnte gezeigt werden, dass die TFF-Produktion nach experimentell induzierten Schleimhautschäden innerhalb weniger Minuten bis Stunden um ein Vielfaches gesteigert werden kann. Weiterhin ist die Expression der TFFs in Zellen, die in den Randbereichen gastrointestinaler Ulcera liegen, stark erhöht. Auch in der als Antwort auf chronische Ulcerationen oder Entzündungen in der gastrointestinalen Mukosa entstehenden Ulcer associated cell lineage (UACL) wird eine erhöhte Expression aller TFFs nachgewiesen [118, 117, 28]. Experimente mit TFF-Knock-out-Mäusen zeigen, dass vor allem TFF1 und TFF3 unabkömmlich sind für die Integrität und Homöostase der Mukosa: TFF1-defiziente Mäuse entwickeln zu einem hohen Anteil multiple gastrale Adenome bis hin zu Karzinomen, während sich in TFF3-Knock-out-Mäusen nach Indomethacin-induzierten Schleimhautschäden eine wesentlich höhere Rate an fatalen blutigen Diarrhöen zeigt als bei Wildtyp-Mäusen der Kontrollgruppe [48, 55].

Im Einzelnen bedeutet die Beteiligung an der Restitution, dass der Funktion der TFFs eine Reihe unterschiedlicher Prozesse zugrunde liegen. Einige wichtige Beispiele seien im Folgenden genannt:

Für alle TFFs konnte in verschiedenen Studien eine promigratorische Wirkung nachgewiesen werden [75, 22, 17, 87]. Außerdem wirken sie antiapoptotisch und verhindern die Anoikis, die sonst nach Lösen der Zell-Zell-Kontakte im Rahmen der Restitution stattfinden würde [8, 41, 102]. In verschiedenen Zelllinien konnte ein antiproliferativer Effekt beobachtet werden [111, 8]. Schließlich sind sämtliche TFFs vor allem über Aktivierung von COX-2- und EGF-Signalwegen potente Angiogenesefaktoren [89]. Es lässt sich sagen, dass die TFFs sehr ähnliche aber dennoch nicht dieselben Funktionen besitzen. Dies scheint vornehmlich an verschiedenen Signalwegen und unterschiedlichen Zielgeweben zu liegen [44].

Die Regulation der TFFs erfolgt über eine Vielfalt an Transkriptionsfaktoren, physikalischen und chemischen Stimuli und epigenetischen Faktoren, welche wiederum an unterschiedlichsten Prozessen von Embryogenese über Wundheilung bis hin zur Tumorentstehung beteiligt sind [21]. Die gewebespezifische Expression z. B. scheint durch Methylierung des Promoters, aber auch über Auto- und Crossinduktion stimuliert zu werden [83, 101]. Als regulatorische Faktoren seien Interleukine, Östrogene, GH (Growth Hormone), EGF, TGF- $\beta$ , FGF und Hypoxie genannt [27, 7, 74].

Über Details zu beteiligten Rezeptoren und Signalwegen der TFFs ist bislang noch wenig bekannt. Es konnten einzelne Bindungsmoleküle entdeckt sowie ein Zusammenspiel mit Muzinen belegt werden, welches dessen rheologische Eigenschaften beeinflusst [71, 90, 104, 43, 49].

Die beschriebenen Funktionen der TFFs spielen auch in Tumorentstehung und -wachstum eine unabdingbare Rolle. So ist es nicht verwunderlich, dass in vielen humanen Tumoren Anzeichen für eine erhöhte TFF-Expression gefunden werden [74, 21]. Einen sehr guten Überblick geben Perry et al. [74].

### **1.3 Trefoil Factor 1**

TFF1 wurde erstmals in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 entdeckt. Da es auf der Suche nach östrogeninduzierten mRNAs gefunden wurde, wurde es zunächst auch „Breast cancer estrogen-inducible“ (BCEI) genannt [56]. Die Sequenz von TFF1 wurde 1984/85 beschrieben [37, 79]. Das Protein besteht aus 60 Aminosäureresten, die eine einzelne Trefoil-Domäne bilden, sowie einem siebten freien Cysteinrest, der sich drei Aminosäuren entfernt vom Carboxy-Terminus befindet [106].

TFF1 kann in drei verschiedenen molekularen Formen vorliegen: als Monomer, Homodimer und Heterooligomer von 25 - 65 kDa, welches durch Disulphid-Brücken gebildet wird [14, 78, 66]. Als Bindungspartner konnte in humaner Magenschleimhaut ein vorher unbekanntes Protein, TFIZ1 (Trefoil Factor Interactions(z)1), identifiziert werden. TFIZ1 (nach neuerer Nomenklatur Gastrokin

2, GKN2) ist ein 18 kDa großes Protein, welches eine Brichos-Domäne enthält und Ähnlichkeiten zu einem Surfactant-assoziierten Protein aufweist [115, 47].

Des Weiteren ist TFF1 mit MUC5AC assoziiert, diese Bindung ist jedoch nicht kovalent [49, 66, 90]. In der Maus konnte darüber hinaus eine direkte Interaktion mit MUC2 nachgewiesen werden. Hier entsteht die Bindung über cysteinreiche Domänen in der von Willebrandfaktor C-Region der Muzine [108]. Die Interaktion der Muzine mit TFF1 scheint jedoch im Gegensatz zu TFF2 keinen größeren Einfluss auf die rheologischen Eigenschaften des Schleims zu haben [104].

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Tatsache, dass das Bakterium *Helicobacter pylori* sehr spezifisch und mit hoher Affinität an dimeres TFF1 bindet, was wiederum für die Bindung des Bakteriums an MUC5AC und somit an das gastrische Epithel notwendig ist [15, 81].

Bei Untersuchungen der regulativen Elemente von TFF1 wurde angrenzend an das 5'-Ende des TFF1-Gens eine Enhancer-Region, genannt EGF/URO, gefunden, welche responsiv für EGF, Östrogene und weitere Faktoren ist [121, 114]. TFF1 interagiert mit dem EGF-Rezeptor und COX-2. Dabei scheint TFF1 über den EGF-Rezeptor reguliert zu werden und auch selbst über ihn zu wirken [86, 88, 101, 89]. Interessanterweise werden auch MUC2 und MUC5AC über den EGF-Rezeptor reguliert [73].

Wie der Zusammenhang der Entdeckung TFF1s bereits nahe legt, wirken auch Östrogene als Regulationsfaktoren. Dies geschieht über den steroid receptor coactivator 1 (src-1) und Estrogen response elements (ERE), welche im TFF1-Promoter vorhanden sind [21, 5].

### 1.3.1 Funktionelle Aspekte

#### **Proliferation und Apoptose**

Verschiedene Versuche mit gastrointestinalen Zelllinien (HCT116, IEC18, AGS) zeigten nach Transfektion mit nachfolgender TFF1-Überexpression bzw. nach Behandlung mit exogen zugeführtem rekombinantem TFF1 reduzierte

Proliferationsraten. Dies geschah aufgrund einer Verzögerung des Übergangs von G1 zu S-Phase durch Erhöhung des Levels des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors p16INK4 und p21CIP1/Wafl, was wiederum die Aktivität von Cyclin D1/cdk4 und Cyclin E/cdk2 inhibierte. Durch diesen Vorgang kommt es schließlich zur Phosphorylierung und Inaktivierung von pRb1 (Retinoblastom Protein) [8, 122]. Das Dimer hatte dabei eine höhere Potenz. Der Prozess war begleitet von einer reduzierten Phosphorylierung und somit reduzierter Aktivierung von MAPK/ERK (Mitogen Activated Protein Kinase) [12].

Im Gegensatz dazu konnte in stabil transfizierten Mammakarzinomzelllinien (MCF7 und T47D) gezeigt werden, dass TFF1 zu einer erhöhten Zellproliferation und gesteigertem Zellüberleben führt [1].

An den bereits oben erwähnten Zelllinien konnte des Weiteren eine Reduktion der induzierten Apoptose durch TFF1-Überexpression oder Behandlung mit exogenem TFF1 nachgewiesen werden. Grund hierfür scheint eine Reduktion der Aktivität der Caspasen 3, 6, 8 und 9 zu sein [8, 122]. Eine Neutralisation von autokrinem TFF1 durch Antikörper reduzierte die Überlebenszeit von MCF-7 und T47D Zellen [1].

Weitere Studien belegen ein gesteigertes substratunabhängiges Wachstum von stabil TFF1-transfizierten MCF-7- und PC/AA/C1-Zellen [1, 88].

### **Migration und Invasion**

In verschiedensten Zelllinien (HT29, MCF-7, MDA-MB-231) konnte in *in vitro* Versuchen ein promigratorisches und proinvasives Potential von TFF1 nachgewiesen werden, wobei erneut das Dimer eine stärkere Wirkung aufwies. Wahrscheinlich werden diese Effekte unter anderem durch die PI3-Kinase und Phospholipase C vermittelt [54, 78, 122, 86, 87, 1]. In PC/AA/C1- und MDCK-Zellen konnte ein invasives Verhalten im Zusammenhang mit TFF1 erst nach Aktivierung von Src und RhoA nachgewiesen werden. Die stabil TFF1-transfizierte Kolonkarzinomzelllinie HCT8/S11 hingegen zeigte direkt und konstitutiv invasives Verhalten [20]. Durch Synergismus mit EGF konnte die promigratorische Wirkung von TFF1 noch verstärkt werden [22].

### **Angiogenese**

Die proangiogene Wirkung von TFF1 konnte an HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) –Zellen sowie in einem CAM (chick chorioallantoic membrane)-Assay gezeigt werden. TFF1 scheint über VEGF-Rezeptor und thromboxane A<sub>2</sub> rezeptor zu wirken, nicht aber über den EGF-Rezeptor oder den COX-2-Rezeptor [89].

### **TFF1-Knock-out-Mäuse**

Charakteristische Befunde bei TFF1-defizienten Mäusen sind eine Hyper- und Dysplasie der gastralen Schleimhaut; alle entwickeln gastrale Adenome und ein großer Anteil Karzinome. Auch führt diese Mutation zu einem fast völligen Verlust der Mukusschicht [48]. Außerdem scheint der Mangel an TFF1 die „Unfolded protein response“ zu veranlassen, einer Stressreaktion des Endoplasmatischen Retikulums (ER). In den gastralen Tumoren der Tiere konnten vergrößerte raue ER beobachtet werden, die dicht gepacktes Material enthielten. Diese Entdeckungen führten zur Hypothese, dass ein TFF1-Mangel eine fehlerhafte Proteinfaltung verursacht [110].

### **Tumorsuppressor oder Onkogen?**

Eine veränderte TFF1-Expression konnte in zahlreichen Karzinomen nachgewiesen werden, darunter in Mammakarzinomen, Magenkarzinomen und Kolonkarzinomen. Wie oben bereits erwähnt, ist TFF1 in einer Mammakarzinomzelllinie entdeckt worden. Die Rolle von TFF1 im Mammakarzinom ist daher schon relativ gut erforscht worden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in einem hohen Anteil der Mammakarzinome, deren Metastasen und Vorläuferläsionen eine TFF1-Überexpression nachgewiesen werden kann. Diese ist meist korreliert mit der Expression des Östrogenrezeptors. TFF1 bedeutet hier einen prognostisch günstigen Marker [82, 57, 4, 24].

Auch in vielen kolorektalen Karzinomen findet sich eine TFF1-Überexpression, hier assoziiert mit HSP70 (Heat Shock Protein 70). Die normale Mukosa ist frei von TFF1 [74].

Beim Magenkarzinom ergibt sich ein uneinheitliches Bild zur Rolle von TFF1. Eine Überexpression von TFF1 kann in atypischen Hyperplasien der Magenmukosa, hyperplastischen Polypen, ungefähr der Hälfte der Magenkarzinome sowie einigen Magenkarzinomzelllinien gefunden werden [74]. Eine TFF1-Überexpression geht mit einer schlechten Prognose einher und ist ein Marker für Lymphknotenmetastasen [57, 82]. Außerdem scheint TFF1, wie bereits erwähnt, eine wichtige Rolle in der Bindung des als potentes Karzinogen im Magen bekannten Bakteriums *Helicobacter pylori* zu spielen [81, 15].

Auf der anderen Seite ist die TFF1-Expression in 50 % der Magenkarzinome reduziert. Vor allem beim Karzinom vom intestinalen Typ scheint TFF1 verloren zu gehen. In diesen Fällen finden sich häufig Mutationen und Deletionen des TFF1-Gens oder eine Hypermethylierung des Promoters, was zum Funktionsverlust des Proteins führt. Auch die erhöhte Rate der Karzinome bei den schon oben erwähnten TFF1-Knock-out-Mäusen spricht für eine Tumorsuppressor-Rolle von TFF1 im Magenkarzinom [48, 72, 109, 105, 40].

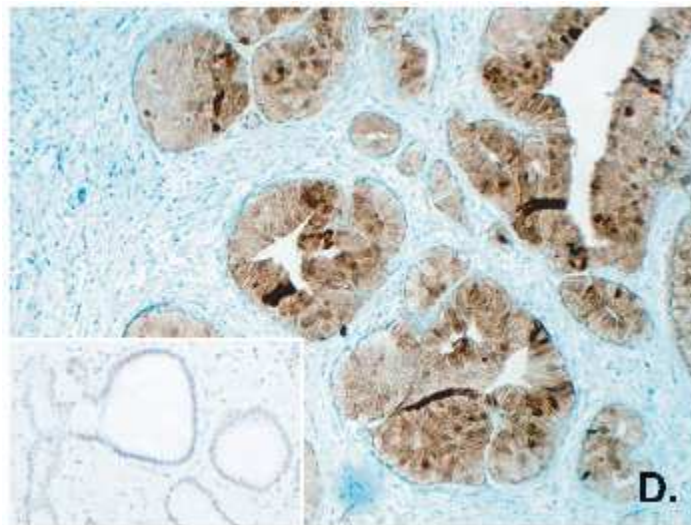
### 1.3.2 TFF1 im Pankreaskarzinom

Unsere Arbeitsgruppe konnte eine Überexpression von TFF1 in PanIN-Läsionen und im Pankreaskarzinom nachweisen [9]. Entsprechende Ergebnisse finden sich auch in der weiteren Literatur. Fast alle zum Thema durchgeführten Arbeiten zeigen eine Überexpression von TFF1 im Pankreaskarzinom im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe. Gleiches gilt für die PanIN-Läsionen [121, 103, 92, 97, 16, 114, 29]. Eine einzelne Studie konnte keine Hinweise auf eine TFF1-Überexpression im Pankreaskarzinom finden, jedoch war sie auch hier in PanIN-Läsionen vorhanden. Dieselbe Studie weist auf einen möglichen Zusammenhang der Entwicklung der PanIN-Läsionen mit der Aktivierung eines Hedgehog-Signalwegs hin, in dessen Folge Gene, die eine Rolle in der Embryonalentwicklung

des Darmrohres spielen, reaktiviert werden [77]. Es wurde außerdem die Koexpression von TFF1 und des EGF-Rezeptors im duktalem Adenokarzinom beschrieben [121].

Erwähnenswert ist, dass in so gut wie allen muzinösen Pankreastumoren, sowohl benigne als auch maligne, eine deutliche TFF1-Überexpression gefunden wird [120, 103, 42].

Über die Expression von TFF1 in gesundem humanen Pankreasgewebe liegen nicht solch einstimmige Daten vor. In einigen Fällen kann jedoch eine, wenn auch niedrige, TFF1-Produktion nachgewiesen werden. Dies gilt sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Die TFF1-Produktion ist hierbei auf die Epithelien der Pankreasgänge beschränkt [52, 103, 97], nur eine Arbeit berichtet auch über TFF1 in endokrinen Pankreasanteilen [36]. Eine Publikation berichtet über TFF1 bei Pankreatitis und in einer Region duktaler Proliferation [16].



**Abbildung 2: Immunhistochemische Analyse der TFF1-Expression in einer PanIN-1B-Läsion;** der Einschub zeigt angrenzendes normales Gangepithel ohne nachweisbare TFF1-Expression. Mit freundlicher Genehmigung aus [77].

Es konnte bislang kein Zusammenhang zwischen der TFF1-Expression und der Prognose gefunden werden. Jedoch zeigten sich Hinweise auf eine Korrelation



zwischen der Intensität der Färbung für TFF1 in der Immunhistochemie und dem Tumorstadium sowie Lymphknotenmetastasen. Eine schwache Färbung deutete hier auf ein eher niedriges Tumorstadium und keine Lymphknotenmetastasen hin [92]. Daten zur Funktion von TFF1 im Pankreaskarzinom lagen zu Beginn dieser Arbeit nicht vor.

## **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Wie zuvor beschrieben, konnte bereits gezeigt werden, dass TFF1 im Pankreaskarzinom und auch in dessen Vorläuferläsionen überexprimiert wird. Des Weiteren spielen einige der Funktionen, mit denen TFF1 bisher in Verbindung gebracht wurde, auch eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung. Eine mögliche funktionelle Rolle von TFF1 im Pankreaskarzinom war jedoch bisher nicht untersucht worden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Funktion von TFF1 in Pankreaskarzinomzellen *in vitro* aufzuklären. Dazu sollten zunächst orientierungshalber funktionelle Überexpressionsversuche mit der Zelllinie HEK-293 durchgeführt werden. Parallel dazu sollten verschiedene Pankreaskarzinomzelllinien auf ihre TFF1-Expression hin untersucht werden, um ein geeignetes Zelllinienpaar zu identifizieren, dessen einer Partner eine hohe, der andere eine niedrige TFF1-Expression aufweist. Mit Hilfe von transienter und stabiler Transfektion sollte TFF1 anschließend in der Zelllinie mit niedriger endogener Expression rekombinant überexprimiert sowie in der Zelllinie mit hoher endogener Expression durch RNA Interference (RNAi) herunterreguliert werden.

Diese Modellsysteme sollten schließlich dazu verwendet werden zu untersuchen, ob eine veränderte TFF1-Expression zu einem veränderten Verhalten der Zellen im Hinblick auf Proliferation, Apoptose, Migration und substratunabhängiges Wachstum führt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht speziell vermerkt, wurden alle Chemikalien und Reagenzien von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Fluka (Buchs SG, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roche Molecular Diagnostics (Mannheim), Serva (Heidelberg) und Sigma Chemie (Deisenhofen) bezogen.

#### 2.1.2 Laborgeräte

7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems (Darmstadt)
BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Blotkammer Mini Trans-Blot	BioRad (München)
Brutschrank (Hereaus 6000)	Hereaus (Hanau)
Cryo 1C Freezing Container	Nalgene (Wiesbaden)
Elektrophoresekammer (EC 120, Mini Vertical System)	EC Apparatus Corporation (Milford, MA, USA)
Entwickler Filmautomat Curix 60 und Reagenzien	Agfa (Köln)
Feinwaage AE 163	Mettler (Gießen)
Luminometer Centro LB 960 (Programm: MikroWin 2000, Version 4.36)	Berthold Technologies (Bad Wildbach)
Magnetrührer MR 2000	Heidolph (Schwabach)
Mikroplate Reader EL x800	BioTek (Friedrichshall)

Mikroskope

- IMT-2
- AxioVert 200

Olympus (Hamburg)

Zeiss (Oberkochen)

Multipipette und Spitzen

Eppendorf (Hamburg)

Neubauer-Zählkammer

Meierhofen

Phero-stab. 300 Electrophoresis

Biotec Fischer (Reiskirchen)

Power Supply

Photometer Dynatech MRX

Dynatech Laboratories  
(Chantilly, VA, USA)

Pipetboy acu

Integra Biosciences IBS  
(Fernwald)

Pipetten

Eppendorf (Hamburg)

Plattenschüttler KS 250 basic

IKA Labortechnik, Staufen

PS 500 XT DC Power Supply

Hoefer Scientific Instruments  
(San Francisco, USA)

Semidry Blot (Trans-Blot SD  
Semidry Transfer Cell )

BioRad (München)

Sterilbank Sterilflow Lamin Air  
HB 2448

Heraeus (Hanau)

Thermoblock DriBlock DB 2A

Techne AG (Jahnsdorf)

Tischzentrifuge (Biofuge Pico)

Heraeus (Hanau)

Ultraschallgerät Labsonic U

B.Braun (Melsungen)

Vortexer MS1 Minishaker

IKA Labortechnik (Staufen)

Wasserbäder

- GFL
- RM 6

GFL (Burgwedel)

Lauda (Lauda-Königshofen)

Zentrifugen

- Varifuge K
- Biofuge pico

Heraeus (Hanau)

Heraeus (Hanau)

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Einmalpipettenspitzen	Gilson (Middleton, WI, USA)
Kryogefäße	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
PP-Röhrchen, 15 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
PP-Röhrchen, 50 ml	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Rundbodenröhrchen, Polystyren	Becton Dickinson (Heidelberg)
sterile Einmal-Pipetten	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 96 Vertiefungen)	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Zellkulturschalen, 6 cm	Becton Dickinson (Heidelberg)
Zellschaber	Greiner Bio-one (Frickenhausen)

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Verwendete Zelllinien

#### **HEK-293**

Als epitheliale Zelllinie wurden HEK-293 Zellen verwendet, eine durch Fragmente des Adenovirus 5 transformierte humane embryonale Nierenzellkultur [26]. Diese Zelllinie zeichnet sich durch einfache Kultur sowie sehr gute Transfizierbarkeit aus.

#### **PaTu 8988t und PaTu 8988s**

Die Zelllinien PaTu 8988t und PaTu 8988s wurden aus einer Lebermetastase eines Patienten mit primärem Adenokarzinom des Pankreas isoliert [19]. Während PaTu 8988t-Zellen ein einschichtiges, adhärentes und konfluierendes Wachstum sowie eine gute Differenzierung zeigen, neigen PaTu 8988s-Zellen zum Wachstum in Zellverbänden sowie zu einem niedrigeren Differenzierungsgrad [45].

### 2.2.2 Medien und Medienzusätze

Die verwendeten Kulturmedien und Zusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, von der Firma PAA (Pasching, Österreich) bezogen.

Alle Zelllinien wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose (4,5 g/l) with L-Glutamin) mit Zusatz von 10 % FCS (fötales Rinderserumalbumin) und 0,05 % Gentamicin gehalten.

Stabile Klone wurden in DMEM mit Zusatz von 10 % FCS und 3 mg Neomycin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) pro ml DMEM kultiviert. Sämtliche Versuche mit stabilen Klonen wurden in Gentamicin-haltigem Medium durchgeführt.

### 2.2.3 Zellkulturbedingungen

Alle Arbeiten wurden mit sterilen Lösungen und unter sterilen Bedingungen verrichtet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Zellkulturflaschen oder -schalen in oben genannten Nährmedien. Bei einer Konfluenz von 80 – 100 % wurden die Zellen passagiert indem sie mit PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen, mit Trypsin von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst und vereinzelt wurden. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm wurde das Zellpellet resuspendiert und der gewünschte Anteil der Zellen in eine neue Zellkulturflasche bzw. andere Zellkulturgefäße überführt.

Versuche mit der Zelllinie PaTu-8988s wurden auf kollagenbeschichteten Zellkulturgefäßen durchgeführt.

### 2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden der Zellsuspension nach Ablösen vom Zellkulturgefäß ca. 10 µl entnommen und auf eine Zählkammer mit der Einteilung nach Neubauer aufgetragen. Nun wurden die Zellen in den vier Eckquadraten ausgezählt. Der Mittelwert der Zellen aus den vier Eckquadraten wurde mit dem Faktor  $1 \times 10^4$  multipliziert. Man erhielt so die Zellzahl, die in einem Milliliter der Zellsuspension enthalten ist.

### 2.2.5 Kryokonservierung

Zur Langzeitlagerung von Zellen wurden diese nach Ablösen vom Kulturgefäß in 10 % DMSO in FCS aufgenommen und je 1 ml der Suspension in ein Kryogefäß überführt. In einem Propanolbad bei -80°C wurde ein langsames Herunterkühlen gewährleistet. Anschließend wurden die Zellen weiterhin bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen erfolgte möglichst schnell bei 37°C. Die Zellsuspension wurde in ein mit Medium befülltes Zellkulturgefäß gegeben. Nach Anheftung der lebendigen Zellen wurde das Kulturmedium gewechselt.

### 2.2.6 Kollagenbeschichtung von Zellkulturgefäßen

Zur Beschichtung der Zellkulturgefäße mit Kollagen wurde unter sterilen Bedingungen eine Lösung von Kollagen Typ I (Rat tail, Sigma (Deisenhofen)) in 250 ml Aqua dest. und 1,458 ml 99 %iger Essigsäure hergestellt. Von dieser Lösung wurde so viel in ein Zellkulturgefäß gegeben, dass der Boden gerade bedeckt war. Die Gefäße wurden für mehrere Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Kollagenlösung wieder abgenommen und die Platten trockneten nochmals im Brutschrank. Wurden sie nicht direkt verwendet, konnten sie gut verschlossen bei 4°C gelagert werden.

### 2.2.7 Gewinnung von konditioniertem Medium

Um konditioniertes Medium zu erhalten, wurden HEK-293-Zellen mit den GFP-Überexpressionskonstrukten (s. u.) transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde das Medium erneuert. Dieses Medium wurde nach zwei Tagen abgenommen und im Verhältnis von 1 : 1 mit frischem Kulturmedium gemischt, um den Nährstoffgehalt wieder zu erhöhen. Diese Mischung wurde dann für die weiteren Versuche verwendet.

## 2.3 Genregulation adhärenter Zellen durch Transfektion

### 2.3.1 Vektoren

#### **GFP Expressions-Vektoren: pdECFP und pdEYFP**

GFP (**G**reen **F**luorescent **P**rotein) ist ein grün fluoreszierendes Protein, welches 1962 in einer Quallenart entdeckt und aus ihr isoliert wurde [91]. Das Protein vereint viele günstige Eigenschaften: Es ist nicht zytotoxisch, benötigt keine zusätzlichen funktionellen Komponenten, lässt sich sehr gut mit vielen anderen Proteinen koppeln und besitzt den Vorteil der direkten Beobachtbarkeit unter dem Mikroskop durch Fluoreszenz. Auch die Verteilung der Proteine auf zelluläre Kompartimente wird darstellbar [96]. Die gleichen Eigenschaften besitzen auch die GFP-Abkömmlinge CFP (**C**yan **F**luorescent **P**rotein) und YFP (**Y**ellow **F**luorescent **P**rotein), die durch Punktmutationen aus GFP hervorgegangen sind und ein jeweils etwas nach blau bzw. gelb verschobenes Fluoreszenzspektrum aufweisen.

In dieser Arbeit wurden Plasmid-Konstrukte verwendet, in denen der offene Leserahmen (ORF) des TFF1-Gens in die Vektoren pdEYFP bzw. pdECFP [96] kloniert vorlag. Dabei entstand in pdECFP ein N-terminales Fusionskonstrukt aus CFP und TFF1. Der Vektor pdEYFP erlaubt prinzipiell die Herstellung von C-terminalen Fusionen von ORFs mit YFP; aufgrund des in der ORF-Sequenz von TFF1 noch vorhandenen Stopp-Codons wurde in diesem Fall jedoch der unfusionierte TFF1-ORF alleine transkribiert. Ein die GFP-Sequenz tragender Vektor (pEGFP) diente als Negativ-Kontrolle. Die fertigen Plasmide besaßen eine CMV-Promotor-Region sowie Antibiotikaresistenzen zur Vervielfältigung in kompetenten Bakterien. Durch Transfektion in die jeweilige Zelllinie konnte somit eine Überexpression von TFF1 erreicht werden. Die Transfektionskontrolle konnte hier visuell über den Anteil fluoreszierender Zellen unter dem Mikroskop erfolgen.

#### **pcDNA<sup>TM</sup>3.2/V5-DEST**

Dieser Vektor wurde von der Firma Invitrogen (Karlsruhe; Katalognr. 12489-019) bezogen. Mit Hilfe der Gateway-Technologie wurde ein TFF1-

Überexpressionsvektor hergestellt. Hierzu wurde zunächst TFF1-cDNA in einen Entry-Klon eingefügt, welcher dann über LR-Rekombination in den Zielvektor gelangte. Dem neu eingefügten DNA-Abschnitt ist ein CMV-Promotor vorgeschaltet. Des Weiteren trägt der Vektor Resistenzen für Ampicillin und Neomycin, die die Vervielfältigung in kompetenten Bakterien bzw. eine Selektion von Zell-Klonen erlauben.

Durch diesen Vektor wird in der Zielzelle eine Überexpression von freiem TFF1 erreicht. Die Transfektionskontrolle erfolgte durch Western Blot oder qRT-PCR.

Als Negativ-Kontrolle diente das leere Plasmid.

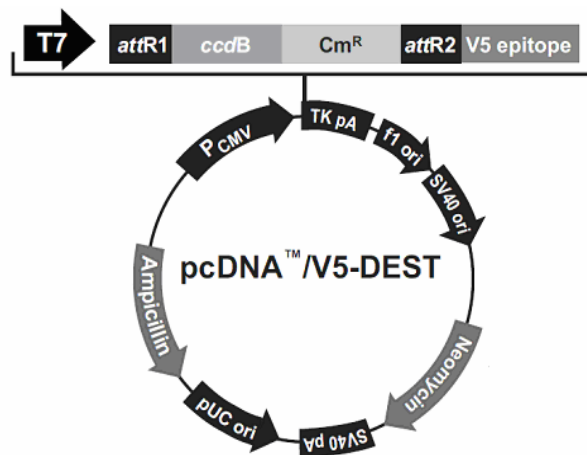


Abbildung 3: Schematische Darstellung des pcDNA/V5-DEST-Vektors (Fa. Invitrogen)

### 2.3.1.1 Vervielfältigung der Vektoren

Die Vervielfältigung erfolgte durch Transformation kompetenter E.coli (Top 10; Invitrogen, Karlsruhe).

Hierzu wurden 0,5 µl Plasmid zu 50 µl E.coli gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 35 Sek. bei 42°C und kurzes Abkühlen auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium (Sigma, Deisenhofen) erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C im Wasserbad. Etwa 100 µl des Ansatzes wurden



auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Selektionsantibiotikum (s. Tabelle) enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank gehalten.

Am nächsten Tag wurde LB-Medium mit dem entsprechendem Antibiotikum versetzt und mit einer der über Nacht gewachsenen Kolonien beimpft. Es erfolgte eine weitere Inkubation über Nacht bei 37°C im Schüttler.

Für Glycerinstocks wurden zu 900 µl der Bakterienkultur 100 µl Glycerin gegeben und bei -80°C gelagert.

Die Isolierung der Plasmide aus den Bakterienkulturen erfolgte mit dem NucleoSpin Plasmid oder NucleoBond PC 500 Kit (Macherey-Nagel, Düren). Hierbei wurden die über Nacht gewachsenen Bakterienkulturen zunächst bei 4°C herunterzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden mit dem im Kit enthaltenen S1-Puffer gelöst und die Bakterien mit S2-Puffer lysiert. Danach wurde das Gemisch mit S3-Puffer neutralisiert. Das Bakterienlysate wurde nun über einen Filter und auf die zuvor mit N2-Puffer vorbereiteten Säulen gegeben. Die Säulen wurden mit N3-Puffer gewaschen. Die Plasmide konnten dann durch N5-Puffer aus der Säule gewaschen werden. Zur Ausfällung der Plasmide wurde Isopropanol zum Eluat gegeben. Die Lösung wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Plasmidpellet wurde in 400 µl dH<sub>2</sub>O mit 40 µl Natrium-Acetat und 1000 µl Ethanol resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet. Anschließend wurde das Pellet wieder in dH<sub>2</sub>O gelöst und die Konzentration gemessen. Gelagert wurde die Plasmid-DNA bei -20°C.

Plasmid	Resistenz	mg/ml LB-Medium
YFP	Gentamicin	20 µg/ml
CFP	Ampicillin	100 µg/ml
GFP	Kanamycin	50 µg/ml
pcDNA 3.2	Ampicillin	100 µg/ml

**Tabelle 1: Selektionszusätze für die Bakterienkultur**

## 2.3.2 Transiente Transfektion humaner Zelllinien

### 2.3.2.1 Suspensionstransfektion mit Effectene

Das Effectene Transfektionsreagenz (Qiagen, Hilden) wurde verwendet, um Überexpressionskonstrukte in HEK-293-Zellen zu transfizieren.

Dafür wurden zunächst die Zellen gewaschen, mit Trypsin abgelöst und dieses durch Kulturmedium inaktiviert. Die Zellzahl wurde bestimmt.

Die Reaktionsansätze wurden nach den Vorgaben des Herstellers vorbereitet (s. Tabelle). Pro 6-Lochplatte wurden dem Reaktionsansatz 400 000 – 600 000 Zellen hinzugefügt. Die Lösung wurde mit Kulturmedium auf zwei Milliliter pro Loch aufgefüllt und auf die vorbereiteten Platten pipettiert.

DNA	Enhancer	EC-Puffer	Effectene
0,4 µg	3,2 µl	98 µl	10 µl

**Tabelle 2: Ansatz für die Transfektion mit Effectene in der 6-Lochplatte**

Nach ca. 24 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde mittels Fluoreszenzmikroskop die Transfektionseffizienz geprüft und die Zellen wurden für weitere Versuche verwendet.

### 2.3.2.2 Transfektion mit Lipofectamine 2000

Mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) wurde Plasmid-DNA in PaTu 8988t-Zellen transfiziert.

Zunächst wurden am Vortag der Transfektion 200 000 bis 300 000 Zellen in einer 6-Lochplatte ausgesät. Eine Stunde vor der Transfektion wurde das normale Kulturmedium durch antibiotikafreies ersetzt. Die Reagenzien und Plasmide wurden getrennt voneinander in serum- und antibiotikafreiem Medium angesetzt. Nach fünf Minuten wurden beide Ansätze gemischt und für eine weitere Stunde inkubiert, bevor die Reagenzien auf die Zellen gegeben wurden. Die Zellen wurden

für drei Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, ehe die Transfektionsreagenzien verworfen und durch Kulturmedium ersetzt wurden.

Medium	DNA	Lipofectamine 2000
250 µl	4 µg	10 µl

**Tabelle 3: Ansatz für die Transfektion mit Lipofectamine 2000 pro well in der 6-Lochplatte**

### 2.3.3 Stabile Transfektion

Ziel der stabilen Transfektion ist es, Zellklone heranzuzüchten, die das gewünschte Plasmid in ihr Genom integriert haben und somit dauerhaft eine Überexpression des Zielgens aufweisen. Bei jeder Transfektion entstehen zufällig Zellen, die das Plasmid in ihr Genom integrieren. Durch eine zusätzlich auf dem Plasmid vorhandene Antibiotikaresistenz können diese Zellen im Anschluss, auch bei Zusatz eines eigentlich für die Zelle toxischen Antibiotikums zum Medium, überleben und so selektiert werden.

Vor Beginn der stabilen Transfektion musste die Konzentration des Selektionszusatzes ermittelt werden, die für untransfizierte Zellen tödlich ist. Dazu wurden untransfizierte Zellen mit einer Konfluenz von ca. 50 % in 6-Lochplatten ausgesät und unterschiedlichen Konzentrationen des Selektionszusatzes im Medium ausgesetzt. Es wurde die Konzentration verwendet, bei der nach sieben Tagen nahezu alle Zellen abgestorben waren. Für die Zelllinie PaTu 8988t ergab sich hier eine Konzentration von 3 mg Neomycin pro Milliliter Medium.

Die Transfektion erfolgte nach oben beschriebenen Protokollen. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen in hoher Verdünnung erneut ausgesät und am darauf folgenden Tag dem Selektionsmedium ausgesetzt. Nach weiteren zehn Tagen wurden einige der nun entstandenen Kolonien vom Kulturgefäß in eine 96-Lochplatte überführt und über die folgenden Wochen vermehrt.

Die relative Expressionsstärke von TFF1 wurde durch Western Blot oder quantitative RT-PCR ermittelt.

### 2.3.4 Transfektion von siRNA

siRNA (small interfering RNA) wird eingesetzt, um die Expression des zu untersuchenden Gens in einer Zelle zu unterdrücken bzw. zu vermindern. Die synthetisch hergestellten RNA-Fragmente binden, analog zum natürlichen Mechanismus in der eukaryoten Zelle, zusammen mit einem Proteinkomplex an einen Zielbereich der mRNA und führen zu deren Spaltung. Es resultiert eine verminderte Expression des entsprechenden Proteins.

In dieser Arbeit wurde siRNA mit Hilfe des siLentFect-Reagenzes (BioRad, München) in PaTu 8988s-Zellen eingebracht. Am Vortag der Transfektion wurden 400 000 Zellen in der kollagenbeschichteten 6-Lochplatte ausgesät. Wenige Minuten vor der Transfektion wurde das Kulturmedium erneuert. Es wurden je 4 µl der 20 µM siRNA (Applied Biosystem, Darmstadt, Sequenzen s. Tabelle) und 4 µl siLentFect in je 150 µl serumfreiem Medium angesetzt. Die siRNA- und Transfektionsreagenz-Ansätze wurden gemischt, für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf die Zellen gegeben. Die Effektivität der Transfektion wurde in Western Blot oder Real-Time PCR überprüft.

siRNA	Sequenz
TFF1 ID # 44942 (im Folgenden siTFF1_1)	5'-GACAGAGACG-UGUACAGUGtt-3'
TFF1 ID # 45038 (im Folgenden siTFF1_2)	5'-GUGUGCAAAUA-AGGGCUGCtt-3'
Negativkontrolle	Silencer Negative Control #1 siRNA

**Tabelle 4: Verwendete siRNA**

## 2.4 Nukleinsäureanalytische und molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA erfolgte mit dem PeqGold Total RNA Kit (PeqLab, Erlangen) unter möglichst RNasefreien Bedingungen. Zunächst wurden die Zellen mit PBS gespült und mit Hilfe eines Zellschabers in Lysepuffer direkt vom Zellkulturgefäß abgelöst. Um das Zelllysate zu homogenisieren, wurden im Kit enthaltene Shredder-Säulen verwendet. Anschließend wurde das Homogenisat mit 1 Vol. 70 % Ethanol versetzt und auf Silikat-Säulen zur RNA-Bindung gegeben. Die Säulen wurden zentrifugiert und mit Waschpuffer gewaschen. Nun konnte optional ein DNA-Verdau durchgeführt werden. Hierzu wurden 10 µl DNase stock Solution mit 70 µl RDD Puffer (beides Qiagen, Hilgen) gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur direkt auf der Membran der Säule inkubiert. In weiteren Schritten wurde die RNA erneut gewaschen und die Säule durch Zentrifugation getrocknet. Zum Schluss wurde die RNA mit RNase-freiem dH<sub>2</sub>O aus der Säule gewaschen. Zur Bestimmung der Konzentration wurde ein Aliquot entnommen. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.4.2 Herstellung von cDNA

Als cDNA (copy DNA) wird DNA bezeichnet, die durch reverse Transkription aus RNA entstanden ist. Sie spiegelt somit das Expressionsprofil einer Zelle wider.

Die Synthese der Erststrang-cDNA erfolgte mit dem Omniscript-Kit der Firma Qiagen (Hilden), dem RNase-Inhibitor SuperaseIn und Oligo(dT)-Primern der Firma Ambion (Darmstadt) nach folgendem Ansatz:

1 µg RNA in 14 µl nucleasefreiem H<sub>2</sub>O

RT-O (reverse Transkriptase)            1 µl

SuperaseIn                                    0,5 µl

Oligo(dT)-Primer                            0,4 µl

dNTPs (10 mM)	2 µl
10 x RT-Puffer	2 µl

Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert und dann auf Eis abgekühlt.

Wenn gewünscht, wurde eine Zweitstrang-Synthese durchgeführt. Hierzu wurde zu den 20 µl Einzelstrang cDNA aus der Erststrangsynthese folgender Ansatz gegeben:

nucleasefreies Wasser	64 µl
10 x Puffer Pol. I	10 µl
dNTP-Mix (10 mM)	4 µl
Polymerase I (E.coli)	2 µl

Die Polymerase und der 10 x Puffer Pol. I stammten von Fermentas (St. Leon-Roth), der dNTP-Mix von Ambion (Darmstadt). Der Ansatz wurde für zwei Stunden bei 16°C im Wasserbad inkubiert und erneut auf Eis abgekühlt.

Anschließend erfolgte der RNA-Verdau unter Zugabe von 1 µl DNase-freier RNase (500µg/ml, Roche, Mannheim) für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad. Aufgereinigt wurde die cDNA mit dem MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen, Hilden). Hier wurde zunächst die DNA-Probe mit 300 µl ERC-Puffer versetzt und zur Bindung auf eine Silikatgel-Säule gegeben. Die Säule wurde zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Durch PE-Puffer und weitere Zentrifugation wurde die Säule gewaschen. Die DNA wurde schließlich mit 10 µl EB-Puffer aus der Säule gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.4.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration und Reinheit der eluierten RNA bzw. DNA wurde mit Hilfe der UV-Spektralphotometrie ermittelt. 2 µl der Nukleinsäure in wässriger Lösung wurden mit 98 µl RNase-freiem Wasser verdünnt und das Absorptionsvermögen in

einer UV-Küvette mikro (Plastibrand, Wertheim) bei den Wellenlängen  $\lambda=260$  nm und  $\lambda=280$  nm gemessen. Um die Konzentration abschätzen zu können, wird davon ausgegangen, dass eine RNA-Lösung von 40  $\mu\text{g/ml}$  bei der Wellenlänge  $\lambda=260$  nm eine Absorption von 1 hat. Daraus ergibt sich die folgende Formel zur Errechnung der Konzentration von RNA in wässriger Lösung:

$$C = A_{260} \times U \times V$$

wobei

$C$  = Konzentration in  $\mu\text{g/ml}$

$U$  = Umrechnungsfaktor in  $\mu\text{g/ml}$ , entspricht bei RNA 40

$V$  = Verdünnungsfaktor in  $\text{ng}/\mu\text{l}$

$A_{260}$  = Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm

entsprechen. Der Quotient aus  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  gibt Aufschluss über den Grad der Kontaminierung der RNA mit Protein. Er sollte idealerweise zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

#### 2.4.4 Quantitative Real-time PCR

Die quantitative Real-time PCR ermöglicht eine Vervielfältigung von Nukleinsäuren, die gleichzeitig eine quantitative Abschätzung zulässt. Durch die Einlagerung von fluoreszierenden Farbstoffen in die amplifizierte cDNA kann deren Menge in Relation zu der eines ebenfalls amplifizierten sog. Housekeeping-Gens (hier das ribosomale Protein RPLP0) gemessen werden und so eine Aussage über das Mengenverhältnis der cDNA in den einzelnen Proben getroffen werden.

Pro Loch der 96-Loch-Reaktionsplatten (MikroAmp, fast optical 96-w Reaction Plate 0,1 ml; Applied Biosystems, Darmstadt) wurden 18  $\mu\text{l}$  Master-Mix vorgelegt und 2  $\mu\text{l}$  cDNA (in einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) hinzupipettiert.

Der Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

Power SybrGreen PCR Mastermix	200 µl
Primer_for	0,5 µl
Primer_rev	0,5 µl
nucleasefreies Wasser	190 µl

Der Power SybrGreen Mastermix stammte von der Firma Applied Biosystems (Darmstadt), die Primer wurden von biomers.net (Ulm) bezogen und lagen in einer Konzentration von 100 pmol/µl vor.

Primer	Sequenz
TFF1_for	5'-GTCACGCCCTCCCAGTGT-3'
TFF1_rev	5'-CTGGAGGGACGTCGATGGTA-3'
RPLP0_for	5'-GTCGGAGGAGTCGGACGAG-3'
RPLP0_rev	5'-GCCTTTATTTCTTGTGTTTGCAAA-3'

**Tabelle 5: In der Real-time PCR eingesetzte Primer**

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Applied Biosystems) ausgewertet.

## 2.5 Proteinanalytische Methoden

### 2.5.1 Proteinextraktion

Zur Proteinextraktion wurden Gesamtzelllysate hergestellt. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in PBS mit einem Zellschaber vom Kulturgefäß abgelöst. Diese Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in PBS unter Zusatz von 1 % Proteinase-Inhibitor (G-biosciences, Houston, Texas (USA)) resuspendiert und die Zellen durch Ultraschall lysiert. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert. Im Überstand befanden sich nun die Proteine aus dem Gesamtzelllysat. Es wurden



Aliquots zur Konzentrationsbestimmung entnommen und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.5.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Methode nach Bradford angewandt. Es wurde das BioRad Protein-Assay Reagenz (BioRad, München) verwendet, welches zunächst 1:5 mit Wasser verdünnt wurde. Je 400 µl des verdünnten Reagenzes wurden zusammen mit 2 µl der Proteinextrakte in einer 1,5 ml halbmikro Küvette (Plastibrand, Wertheim) gemischt. Die Absorption dieser Lösung wurde anschließend bei 595 nm im Photometer gegen einen Leerwert gemessen. Für jede Messung wurde außerdem eine Konzentrationsreihe mit definierten Mengen (1-8 µg/µl) BSA (bovines Serumalbumin; Sigma, Deisenhofen) angelegt, die die Errechnung der Proteinkonzentration in den zu bestimmenden Proben ermöglichte.

### 2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese erlaubt eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe. Aufgrund ihrer Ladungseigenschaften wandern sie entlang eines elektrischen Feldes, die Größe der Proteine entscheidet über ihre Laufgeschwindigkeit.

Für die Elektrophorese wurden die Proteinextrakte zunächst mit 4 x Probenpuffer verdünnt und 1/10 Volumen DTT (1 M Dithiothreitol) hinzugefügt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proteine für 5 Minuten bei 95°C denaturiert.

#### **Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese:**

##### Trenngelpuffer

1,5 M Tris Base (36,34 g)

0,4 % SDS (4 ml, 20 %ig)

mit AMPUWA auf 200 ml  
auffüllen

pH 8,8

##### Sammelgelpuffer

0,5 M Tris Base (12,11 g)

0,4 % SDS (4 ml, 20 %ig)

mit AMPUWA auf 200 ml  
auffüllen

pH 6,8

10 x Laufpuffer

250 mM Tris Base (30,3 g)

1,92 M Glycin (144 g)

1 % SDS (10 g)

mit AMPUWA auf 1 Liter  
auffüllen

4 x SDS Probenpuffer

2 g Tris HCl (253 mM)

25 mg Bromphenolblau

25 ml AMPUWA

mit Glycerol auf 45 ml auffüllen

pH 6,8 einstellen, dann + 5 ml

20 %ige SDS-Lösung (2 %)

**Ansatz für ein Sammelgel:**

Sammelgelpuffer

500 µl

AMPUWA

1180 µl

Acrylamid (30 %/0,8 %)

320 µl

APS (10 %)

5 µl

TEMED

2,5 µl

**Ansatz für je zwei Trenngele:**

	10 %	15 %	21 %
Trenngel-puffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
AMPUWA	3,67 ml	2,0 ml	0 ml
Acrylamid (30/0,8)	3,33 ml	5,0 ml	7 ml
Glycerol	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
10 % APS	20 µl	20 µl	20 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl

Die Gele wurden zwischen vorbereitete und mit Ethanol gereinigte Glasplatten gegossen. Als Stoppgel diente 200 µl Trenngellösung mit je 1,5 µl TEMED und APS (10 %), welche als erste zwischen die Platten gegossen wurde. Sobald das Stoppgel fest war, wurde die Trenngellösung mit APS und TEMED versetzt und

ebenfalls zwischen die Platten pipettiert. Sofort danach wurde die Sammelgellösung mit APS und TEMED versetzt und vorsichtig auf das noch nicht gehärtete Trenngel pipettiert. Nun wurde noch der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Die Gele härteten ca. 45 Minuten. Nicht sofort verwendete Gele wurden in feuchtes Saugpapier und Folie eingewickelt und bei 4°C gelagert.

Die Proteine liefen bis zur Grenze von Sammel- zu Trenngel mit einer Stromstärke von 120 V, bis zum Gelende dann mit 200 V. Für TFF1 wurden 15- oder 21 %ige Gele, für PARP 10 %ige Gele verwendet.

#### 2.5.4 Western-Blotting

Das Western-Blotting ermöglicht die Sichtbarmachung der aufgetrennten Proteine nach einer Elektrophorese. Die Proteine wandern nun nicht mehr innerhalb des Gels, sondern vom Gel auf eine Membran. Dort binden spezifische Antikörper an die Proteine. Diese Antikörper wiederum können durch Peroxidase-gekoppelte Antikörper erkannt werden. Durch eine Luminol-Reaktion wird die Chemilumineszenz angeregt und belichtet so einen Film. Auf diesem kann dann nach der Entwicklung das Vorhandensein des zu untersuchenden Proteins abgelesen werden.

##### **2.5.4.1 Übertragung von Proteinen auf eine PVDF- bzw. NC-Membran**

Die Übertragung von Proteinen aus dem Gel auf eine Membran geschah für TFF1 im Tank-Blotting Verfahren (Kammer von BioRad, München) bei 400 mV für 20 Minuten. Geblottet wurde auf eine PVDF-Membran (Porendurchmesser 0,45 µm; Millipore, Schwalbach).

Für PARP wurde für eine Stunde bei 400 mA im Tank-Blotting Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schuell, Dassel) geblottet.

Die PVDF-Membran musste vor der Verwendung für einige Sekunden in 100 % Methanol angefeuchtet werden.

Blotting Puffer

100 ml Towbin 10x

200 ml Methanol

700 ml Ampuwa

### **2.5.4.2 Immunologische Detektion der an die Membran gebundenen Proteine**

Um die Proteine auf der Membran sichtbar zu machen, schließt sich an das Blotten die immunologische Detektion an.

Hierzu mussten zunächst unspezifische Proteinbindungen durch Inkubation der Membran in 5 % Magermilch in TBST für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt werden. Anschließend wurde der gewünschte Erstantikörper auf die Membran in den unten angegebenen Konzentrationen gegeben und alles bei 4°C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert.

TBS (10 x)

24,2 g Tris Base

80 g Natriumchlorid

15 ml HCl (37 %)

auf 1 Liter auffüllen

pH 7,6 einstellen

TBST (1 x)

100 ml TBS (10 x)

900 ml AMPUWA

1 ml Tween 20

Am zweiten Tag wurde die Membran viermal für zehn Minuten in 1 x TBST gewaschen. Anschließend wurde der Zweitantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde nochmals viermal mit TBST gewaschen.

Als Detektionsreagenz wurde ECL (GE Healthcare, München) verwendet. Für TFF1-Western Blots wurde das ECL Plus Reagenz eingesetzt. Die Filme (Amersham Hyperfilm ECL; GE Healthcare, München) wurden die gewünschte Zeit belichtet und entwickelt.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
anti - TFF1 (rabbit polyclonal)	1 : 500	Santa Cruz, Heidelberg
anti - rabbit HRP	1 : 10 000	Cell signaling, Danvers, MA, USA
anti - PARP	1 : 1 000	Cell signaling, Danvers, MA, USA
anti - GFP	1 : 1000	Roche, Mannheim
anti - Aktin-HRP (goat polyclonal)	1 : 5000	Santa Cruz, Heidelberg

**Tabelle 6: Im Western-Blot verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen**

## 2.6 Funktionelle Versuche

### 2.6.1 Untersuchung des Migrationsverhaltens

Der Nachweis von gerichteter Migration *in vitro* erfolgte mit Zellkultureinsätzen, deren Boden aus einer mit Poren versehenen PET-Membran bestand (Porengröße 8 µm für 24-Lochplatten, Becton Dickinson, Heidelberg). Zwischen den beiden Seiten der Membran bestand ein Serumgradient.

Für den Assay wurden die entsprechenden Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin vom Kulturgefäß abgelöst. Die Zellzahl wurde bestimmt und auf 200 000 Zellen pro Milliliter eingestellt. Die Zellen wurden zentrifugiert und in serumfreiem Medium resuspendiert.

In der speziellen 24-Lochplatte (Multiwell Primaria 24 well, Becton Dickinson, Heidelberg) wurden 750 µl DMEM mit 1 % FCS vorgelegt. Anschließend wurden die Zellkultureinsätze in die Löcher gesetzt. In jeden Einsatz wurden 250 µl der Zellsuspension pipettiert.

Nun wurden die Platten für vier Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Einsätze aus der Platte genommen, das Medium ausgeleert und die Einsätze in PBS gewaschen. Das PBS wurde wiederum ausgeleert und der Einsatz durch mehrmaliges Kreisen mit gefalteten fusselfreien Kosmetik-Tüchern (Scott facial tissues, Kimberly-Clark Professional, Surrey, UK) ausgewischt. Auf diese Weise wurden die noch an der Oberseite der Membran befindlichen, also nicht migrierten Zellen, entfernt. Zur Färbung der an der Unterseite der Membran verbliebenen, also migrierten, Zellen wurden die Einsätze in Kristallviolettlösung (0,1 g in 50 ml 20 %igem Methanol; Kristallviolett der Fa. Serva, Heidelberg) zehn Minuten auf einem Plattenschüttler inkubiert. Die Einsätze wurden abermals mit PBS gespült und mit einem gefalteten Tuch ausgewischt. Zuletzt wurden die Einsätze mit Wasser gespült und an der Luft getrocknet.

Um die Anzahl der migrierten Zellen zu bestimmen, wurden die Einsätze zur besseren Orientierung auf einen mit Gitterlinien versehenen Objektträger (Neolab, Heidelberg) gestellt und die Gesamtzahl der Zellen in allen vollständigen Kästchen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

### 2.6.2 Untersuchung des substratunabhängigen Wachstums

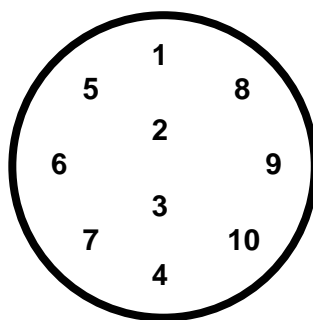
Das substratunabhängige Wachstum wurde mit Hilfe des Soft-Agar-Assays untersucht. Ziel dieses Versuches ist es, die Proliferationsfähigkeit der Zellen zu beurteilen, wenn diesen weder die Anheftung an ein extrazelluläres Substrat noch die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zur Verfügung steht. Dieser Zustand führt physiologischerweise zu Anoikis.

Es musste zunächst ein steriler Bacto-Agar hergestellt werden. Je 5 g des Agars (Difco certified, Detroit, Michigan (USA)) wurden in 100 ml AMPUWA gelöst und die Lösung anschließend autoklaviert. Zur besseren Handhabung wurde die Lösung auf mehrere Aliquots von je ca. 10 ml aufgeteilt. So konnte der Agar bis zur weiteren Verwendung in steril verschlossenen Gefäßen bei Raumtemperatur gelagert werden.

Für den Versuch wurde der durch Erhitzen auf 41°C wieder verflüssigte Bacto-Agar im Verhältnis von 1 : 10 mit vorgewärmtem Zellkulturmedium gemischt. Je 2 ml dieser Lösung wurden in vorbereitete 6-Lochplatten pipettiert, Luftblasen soweit möglich vermieden. Der Rest der Lösung wurde im Wasserbad aufbewahrt, um das Festwerden zu vermeiden.

Während das Agar-Medium-Gemisch in den 6-Lochplatten erstarrte, wurden die Zellen vorbereitet. Die Zellen wurden auf die übliche Weise abgelöst und vereinzelt. Es wurde eine Konzentration von 40 000 Zellen pro Milliliter in normalem Zellkulturmedium vorbereitet. Diese Zellsuspension wurde nun mit dem doppelten Volumen an verbliebener Medium-Agar-Lösung gemischt. Je 750 µl dieses Gemisches wurden auf die vorbereitete Agar-Medium-Unterlage pipettiert. Sobald diese Schicht fest geworden war, wurde sie mit ca. 1 ml Medium überschichtet und die Platten für das weitere Zellwachstum im Brutschrank inkubiert. Alle zwei bis drei Tage wurde etwa ein Milliliter Medium zugegeben, um das Austrocknen des Agars zu vermeiden.

Die Beurteilung des Wachstums erfolgte nach sieben (HEK-293), zehn (PaTu 8988t) oder 14 Tagen (PaTu 8988s). Als erfolgreiches Wachstum galt die Entwicklung eines Zellklons (Zellhaufen von mindestens drei Zellen). Ausgezählt wurden je zehn Gesichtsfelder in je drei wells pro Ansatz unter dem Lichtmikroskop.



**Abbildung 4: Schema der Gesichtsfeldauszählung im Soft-Agar-Assay**

Jedes well wurde in zehn Gesichtsfelder unterteilt. Anschließend wurden die Mittelwerte gebildet.

### 2.6.3 Untersuchung der Zellvitalität und des Zellwachstums

#### 2.6.3.1 MTT-Assay

Der MTT-Assay gibt Auskunft über die Menge vitaler Zellen in der untersuchten Zellpopulation. So kann nachgewiesen werden, ob nach einer bestimmten Zeit im Vergleich zu einer anderen Population mehr oder weniger vitale Zellen vorhanden sind.

24 Stunden nach Transfektion wurden gleiche Mengen der zu untersuchenden Zellen in 6- oder 12-Lochplatten ausgesät und für eine Zeitspanne von 24 bis 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und durch MTT-haltiges, FCS-freies Medium ersetzt. Dabei wurde 1 ml MTT mit 12 ml Medium gemischt. Für die MTT-Lösung wurden 5 mg Thiazolylblau in 1 ml PBS gelöst.

Nun wurde bis zur Blaufärbung der Zellen erneut im Brutschrank inkubiert. Da das MTT-Reagenz durch die Mitochondrien verstoffwechselt wird, werden auf diese Weise ausschließlich vitale Zellen angefärbt.

Das Medium wurde abermals abgesaugt. Um den Farbstoff aus den Zellen zu lösen, wurden pro 6-Loch 500 µl Solubilization Solution (10 % Triton X-100 und 0,1 M HCl in Isopropanol) hinzupipettiert und die Zellen für 10 Minuten auf einem Plattenschüttler lysiert.

Zur Quantifizierung der Farbstoffmenge wurden 50 µl des Lysats mit 50 µl PBS in eine 96-Lochplatte gegeben und die Absorption bei 570 nm im Fotometer (Dynatech MRX, Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA) gemessen.

#### 2.6.3.2 Cell Proliferation ELISA, BrdU

Mit Hilfe des Cell Proliferation ELISA<sup>®</sup> (Roche, Mannheim) ist es möglich, die Zellproliferation zu quantifizieren. Das Prinzip des Assays besteht darin, während der DNA-Synthese der Zelle 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU) anzubieten, welche dieses dann anstelle von Thymidin in die neu synthetisierte DNA einbaut. Danach werden die Zellen fixiert und die DNA denaturiert, so dass das eingebaute BrdU



durch spezifische Antikörper gebunden werden kann. Die mit dem Antikörper konjugierte Peroxidase ermöglicht nun eine Detektion durch das Luminol-enthaltende Substrat. Die Quantifizierung des entstandenen Substrats ist durch Chemilumineszenz-Detektion möglich.

Zur Durchführung des Assays wurde eine entsprechende Anzahl Zellen (5000 Zellen der PaTu 8988s-Zellen, 10000 Zellen aller anderen Zelllinien) in mehrfacher Bestimmung in speziellen 96-Lochplatten (Greiner, Frickenhausen) in je 100 µl Medium ausgesät. Um ein Austrocknen zu vermeiden, wurden die äußeren Löcher der Platte mit Medium befüllt und nur die inneren für den Versuch verwendet. Sofern erforderlich, wurden die Zellen vor der Inkubation mit BrdU für 24 Stunden in serumfreiem Medium gehalten.

Die Inkubation mit BrdU erfolgte durch Zugabe von 10 µl einer BrdU-Medium-Mischung (Verhältnis 1:100) zu jedem Loch. HEK-293- und PaTu 8988t-Zellen wurden für vier, PaTu 8988s-Zellen für 24 Stunden inkubiert. Um eine Verzerrung der Werte durch Hintergrundaktivitäten zu vermeiden, wurden je zwei Löcher für nur 10 Minuten mit BrdU behandelt und diese Werte bei der Auswertung von den anderen subtrahiert.

Nach der Inkubation mit BrdU wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit der im Kit enthaltenen Fixierlösung für 30 min denaturiert. Die Fixierlösung wurde wieder entfernt und 100 µl der vorbereiteten BrdU-Antikörperlösung auf die Zellen gegeben. Nach 1 Stunde wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Spülen mit Waschlösung wieder entfernt. Die Lumineszenz wurde durch Zugabe von 100 µl Substratlösung in jedes Loch gestartet und im Luminometer gemessen. Um gegenseitige Beeinflussungen von benachbarten wells zu vermeiden, musste vor der Messung eine schwarze Pappe unter die 96-Lochplatte gelegt werden.

## 2.6.4 Untersuchung von Zelltod

### 2.6.4.1 Induktion von Zelltod

Zur Induktion von Zelltod wurde rekombinantes humanes TRAIL (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand; R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) verwendet. Die nötigen Konzentrationen waren in Vorversuchen mit anschließendem Cell death detection ELISA bestimmt worden. Für die Zelllinie PaTu 8988s wurde eine Konzentration von 25 ng/ml Medium, für PaTu 8988t eine von 75 ng/ml Medium verwendet.

### 2.6.4.2 Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>

Das Prinzip dieses Tests besteht darin, freiliegende DNA und Nucleosomen durch einen Histon-Biotin-Antikörper an eine streptavidin-beschichtete Platte zu binden. Gleichzeitig bindet ein peroxidase-gekoppelter DNA-Antikörper an die DNA. Die Peroxidase setzt als Substrat ABTS (Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure) um. Dies erzeugt einen Farbumschlag nach grün, welcher photometrisch bestimmt werden kann.

Für diesen Assay wurden die Zellen in dreifacher Ausführung in 96-Lochplatten ausgesät. Für Versuche wurden je 5000 Zellen in 100 µl Medium der Zelllinie PaTu 8988t und je 10000 Zellen der Zelllinie PaTu 8988s eingesetzt. Um Austrocknung zu vermeiden, wurden die am Rand befindlichen wells mit je 100 µl Medium versehen.

Nach 4-6 Stunden wurde eine Hälfte der Zellen mit TRAIL in der entsprechenden Konzentration versehen (100 µl Medium mit der doppelten TRAIL-Konzentration wurden hinzupipettiert), die Kontrollgruppe erhielt zusätzlich 100 µl Kulturmedium. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die gesamte 96-Lochplatte zentrifugiert, um zu gewährleisten, dass auch abgelöste Zellen der Auswertung zugeführt werden konnten. Dann wurde das Medium vorsichtig abgenommen und die Zellen mit 200 µl Lysepuffer lysiert. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die Platte erneut

zentrifugiert und 20 µl des Überstandes auf eine spezielle Streptavidin-beschichtete Platte pipettiert. Es wurde ab hier auch eine Positiv- sowie eine Hintergrund-Kontrolle mitgeführt. Zu den Proben kamen nun 80 µl eines Immunreagenzes, welches sich aus DNA- und Histon-Biotin-Antikörpern sowie einem Puffer zusammensetzte. Nachdem die Platten abgedeckt für zwei Stunden inkubiert worden waren, wurden sie dreimal mit Inkubations-Puffer gewaschen.

Die Farbreaktion wurde durch je 100 µl der im Kit enthaltenen ABTS -Lösung ausgelöst und nach ausreichender Farbentwicklung abgestoppt. Die Messung erfolgte bei 405 nm im Photometer.

#### **2.6.4.3 Analyse der PARP-Spaltung**

Die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) ist ein DNA-Reparatur-Enzym, welches spezifisch an Strangbrüche bindet. Bei der Apoptose wird PARP durch Proteasen gespalten. Die Spaltprodukte lassen sich im Western Blot nachweisen. Da die Spaltung von PARP nur im Rahmen der Apoptose vorkommt, lässt sich ein Zustandekommen der Effekte durch Nekrose ausschließen.

In dieser Arbeit wurden die zu untersuchenden Zellen zunächst über Nacht mit TRAIL behandelt und am folgenden Tag Gesamtzelllysate hergestellt. Diese wurden mit Hilfe des PARP-Antikörpers im Western Blot auf die Entstehung der oben erwähnten Spaltprodukte untersucht.

### **2.7 Statistische Auswertung**

Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm Microsoft EXCEL durchgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Testgruppe wurden mit Hilfe eines zweiseitigen ungepaarten Student's t-Test ermittelt. Ein Unterschied wurde als signifikant interpretiert, sofern sich für p Werte < 0,05 ergaben. Die in den Diagrammen aufgetragenen Fehlerbalken entsprechen der einfachen Standardabweichung.

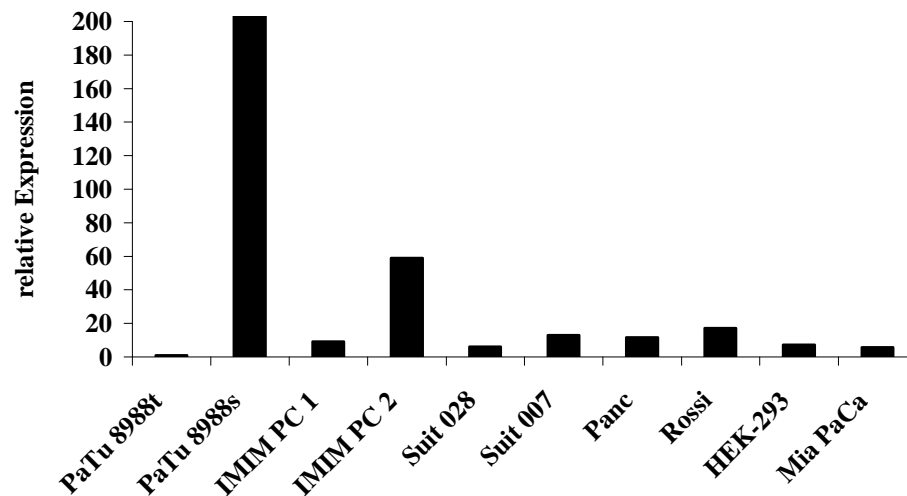
Soweit nicht anders erwähnt, wurde jeder Versuch mindestens in Doppelbestimmung ausgeführt. Die Versuche wurden dreimal wiederholt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Expression von TFF1 in verschiedenen Zellkulturlinien

Vorarbeiten konnten bereits zeigen, dass TFF1 in pankreatischen Neoplasien stärker exprimiert wird als in gesundem pankreatischem Gewebe. Da in dieser Arbeit das funktionelle Verhalten von Pankreaskarzinomzellen *in vitro* untersucht werden sollte, wurden nun zunächst verschiedene Pankreaskarzinomzelllinien hinsichtlich ihrer TFF1-Expression untersucht. Wie bereits erwähnt, wurde ein Zelllinienpaar gesucht, dessen Partner möglichst große Unterschiede in der TFF1-Expression aufweisen, um eine potentiell onkogene Rolle von TFF1 *in vitro* analysieren zu können. Praktisch wurde hierzu RNA aus verschiedenen Zelllinien isoliert, anschließend in cDNA umgeschrieben und schließlich die relative Expression mit Hilfe der real-time PCR ermittelt.

Mehrere voneinander unabhängige Bestimmungen konnten belegen, dass die Expression von TFF1 in der Zelllinie PaTu 8988s um mehrere Tausend höher ist als in allen anderen getesteten Zelllinien. In der Schwesterzelllinie PaTu 8988t hingegen zeigte sich ein sehr niedriges Level an TFF1-RNA. In der Zelllinie IMIM PC 2 ließ sich ebenfalls ein relativ hohes Level von TFF1-RNA nachweisen; auch hier zeigte sich in der Schwesterzelllinie IMIM PC 1 eine deutlich geringere Expression.

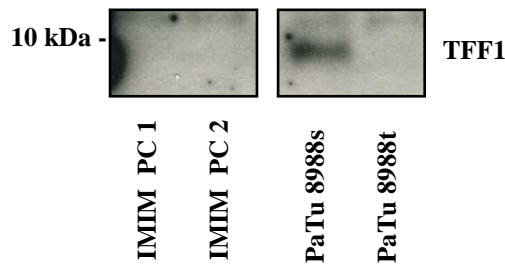


**Abbildung 5: Relative Expression von TFF1 in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien**

Die Expression wird im Bezug zur Zelllinie PaTu 8988t dargestellt, die somit ein Expressionslevel von 1 erhält. Die Normalisierung erfolgte auf RPLP0. Das Zelllinienpaar PaTu 8988t und PaTu 8988s zeigt auf RNA-Ebene große Unterschiede in der TFF1-Expression. Ebenso verhält es sich bei dem Paar IMIM PC 1 und IMIM PC 2, hier ist der Unterschied jedoch kleiner.

Um die Ergebnisse der real-time PCR zu bestätigen und sicherzustellen, dass die Expression von TFF1 auch auf Proteinebene stattfindet, wurden Western Blots angefertigt. Hierzu wurden Gesamtzelllysate der in der PCR als potentielle Testsysteme in Frage kommenden Zelllinien hergestellt und analysiert.

Für PaTu 8988s konnte eine starke Expression von TFF1 auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. IMIM PC 2 zeigte hingegen nur eine schwache TFF1-Produktion.



**Abbildung 6: Western Blot-Analyse der TFF1 Expression**

Es wurden Gesamtzelllysate der Zelllinienpaare hergestellt, die in der real-time PCR größere Unterschiede in der TFF1-Expression zeigten. Auf Proteinebene lassen sich nun kaum Unterschiede hinsichtlich der TFF1-Produktion zwischen den Zelllinien IMIM PC 1 und IMIM PC 2 erkennen, jedoch sieht man einen deutlichen Unterschied zwischen PaTu 8988s und PaTu 8988t.

Somit ergab sich mit den Zelllinien PaTu 8988t und PaTu 8988s ein gutes System zur Untersuchung der Effekte von TFF1, da, wie bereits erwähnt, beide Zelllinien sogar von demselben Patienten stammen, sich aber stark in der TFF1-Expression unterscheiden.

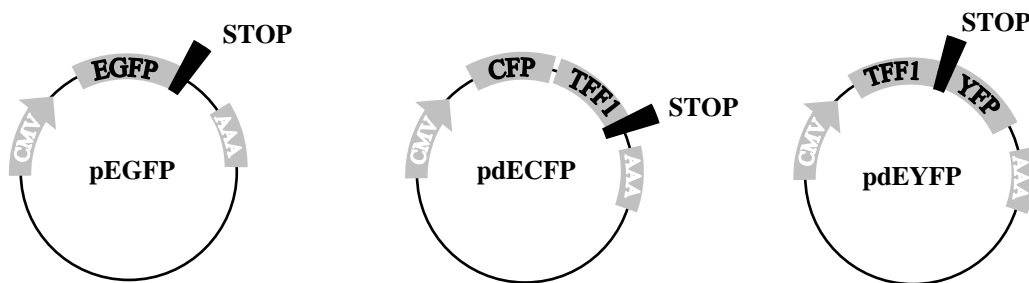
## 3.2 Rekombinante Überexpression von TFF1

### 3.2.1 Transiente Überexpression

Um nun den Einfluss von TFF1 auf das Verhalten der Zellen *in vitro* untersuchen zu können, war es nötig, diese gentechnisch zu verändern. Es sollten Zellpopulationen entstehen, die sich theoretisch nur durch ihren Level an TFF1-Expression unterscheiden.

Zunächst wurden die Zelllinien PaTu 8988t und HEK-293 transient mit Fluoreszenz-markierten Überexpressionskonstrukten transfiziert. Der Vorteil dieser GFP-abgeleiteten Konstrukte liegt unter anderem in der schnellen, einfachen und zu verschiedenen Zeiten an derselben Zellpopulation durchführbaren Überprüfbarkeit der Transfektionseffizienz. Transfizierte Zellen zeigen unter dem Fluoreszenzmikroskop bei Anregung der entsprechenden Wellenlänge farbige Signale.

Wie bereits beschrieben, lag der TFF1-ORF in dem Plasmid pdECFP als N-terminales Fusionsprotein mit CFP vor. Es entstand also bei der Translation ausschließlich das Fusionsprotein. Der zweite verwendete Vektor, pdEYFP, erlaubt grundsätzlich die Herstellung von C-terminalen Fusionskonstrukten mit YFP. Auf Grund des bereits erwähnten im TFF1-ORF mitklonierten Stopp-Codons war in diesem Falle jedoch zu erwarten, dass ausschließlich natives TFF1 hergestellt und die Proteinsynthese nach Translation der TFF1-Sequenz abgebrochen werden würde. Eine Produktion des YFP-Proteins würde demnach nicht stattfinden (Abbildung 7).



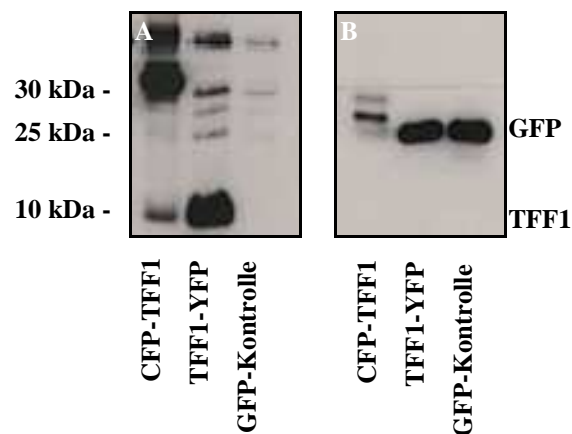
**Abbildung 7: Schematische Darstellung der GFP-Konstrukte**

- (A) Der pEGFP-Ausgangsvektor.
- (B) Auf dem pdECFP-Vektor liegt die TFF1-Sequenz direkt hinter der CFP-Sequenz. Es wird ein Fusionsprotein aus CFP und TFF1 hergestellt, transfizierte Zellen zeigen eine typische Fluoreszenz.
- (C) Im pdEYFP-Vektor liegt zwischen der TFF1- und der YFP-Sequenz ein Stop-Codon; es müsste also hier die Translation abgebrochen werden. Als Folge würde kein YFP-Protein hergestellt, da kein erneutes Startsignal vorliegt. Die Zellen würden mangels YFP-Protein keine Fluoreszenz aufweisen.

CMV = CMV-Promoter; AAA = Poly-A-Signal; STOP = Stopp-Codon.

Interessanterweise zeigte sich dann aber auch nach Transfektion mit dem YFP-Konstrukt eine spezifische YFP-Fluoreszenz in den transfizierten Zellen (Abbildung 9). Es musste also trotzdem eine Produktion des YFP-Proteins stattgefunden haben. Um diese Beobachtungen zu bestätigen und um sicher zu stellen, dass auch TFF1 hergestellt worden war, wurden Western Blots mit

Gesamtzelllysaten transfizierter HEK-293-Zellen angefertigt. Nachdem die Membranen mit dem TFF1-Antikörper behandelt worden waren, wurden sie gewaschen und anschließend nochmals mit einem gegen GFP gerichteten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper reagiert sowohl mit GFP als auch mit YFP und CFP. Neben dem erwarteten spezifischen Nachweis von CFP-TFF1-Fusionsprotein (ca. 30 kDa) bzw. nativem TFF1 (ca. 8 kDa) in den entsprechend transfizierten Zellen (Abbildung 8 A) ließ sich unerwarteterweise in den TFF1-YFP-transfizierten Zellen auch natives (unfusionsiertes) YFP-Protein nachweisen (Abbildung 8 B, Spur 2).



**Abbildung 8: Western Blot-Analyse der Expression von TFF1 und den gekoppelten Fluoreszenzproteinen in HEK-293-Zellen**

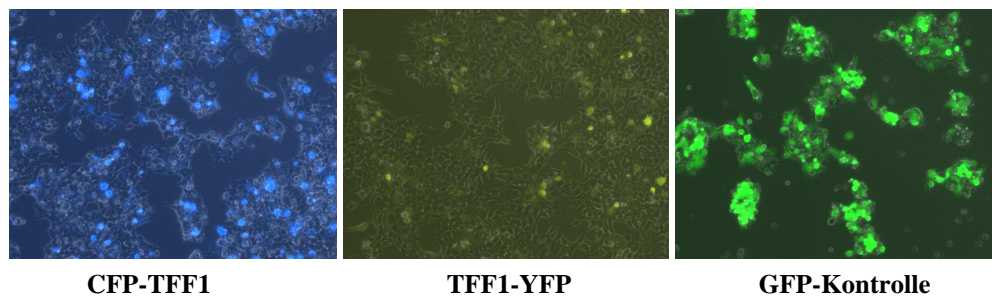
- (A) Nach Inkubation der Membran mit dem TFF1-Antikörper. Man erkennt eine breite TFF1-Bande in der YFP-Bahn und eine schwächere in der CFP-Bahn. Ebenfalls dort erkennt man die Bande des Fusionsproteins aus CFP und TFF1 kurz über der 30 kDa-Markierung.
- (B) Nach Inkubation mit dem GFP-Antikörper. Dieser Antikörper reagiert ebenso mit den von GFP abgeleiteten Proteinen YFP und CFP. Gut zu sehen sind die annähernd gleich starken Banden in der YFP- und GFP-Bahn. Das CFP Fusionsprotein ist als dünnere Bande wenige kDa höher zu erkennen.

Diese Beobachtungen legten nahe, dass offenbar mit recht hoher Frequenz der relativ kurze offene Leserahmen des TFF1-Gens überlesen und die Translation erst am ATG-Codon des YFP-Gens initiiert wurde. In den transfizierten Zellen entstand demnach sowohl natives TFF1 als auch natives YFP, jedoch kein Fusionsprotein.



In den CFP-transfizierten Zellen zeigte sich wie erwartet das Fusionsprotein. Die GFP-Transfektion führte wie erwartet zu keiner Veränderung der TFF1-Produktion.

HEK-293 Zellen ließen sich zuverlässig mit den Überexpressionsplasmiden unter Verwendung des Effectene Reagenzes transfizieren. Dabei wurde eine Transfektionseffizienz von ca. 60 % erreicht.



**Abbildung 9: Transient transfizierte HEK 293 im Fluoreszenzmikroskop**

Die Abbildung zeigt Zellen 48 Stunden nach Transfektion mit den Überexpressionskonstrukten.

PaTu 8988t Zellen ließen sich nur sehr schlecht transfizieren. Bei transienter Transfektion konnten auch mit verschiedenen Transfektionsreagenzien Transfektionsraten von maximal 25 % nicht überschritten werden, so dass im transienten Ansatz keine ausreichende Effizienz zur Durchführung weiterführender Experimente erreicht werden konnte.

### 3.2.2 Etablierung stabil transfizierter Zellklone

Aufgrund der schlechten Transfektionseffizienz im transienten Ansatz wurden stabil TFF1-überexprimierende Zellklone der Zelllinie PaTu 8988t erzeugt. Eine weitere Verwendung dieser Zellklone wäre darüber hinaus in *in vivo*-Versuchen möglich.

Anfänglich wurde versucht, durch eine Doppeltransfektion der GFP-Konstrukte und eines Hygromycin-Vektors stabile Klone der Zelllinien HEK-293 und PaTu

8988t zu etablieren. Der Hygromycin-Vektor trug hierbei die Antibiotikaresistenz, die zur Selektion der Klone notwendig ist.

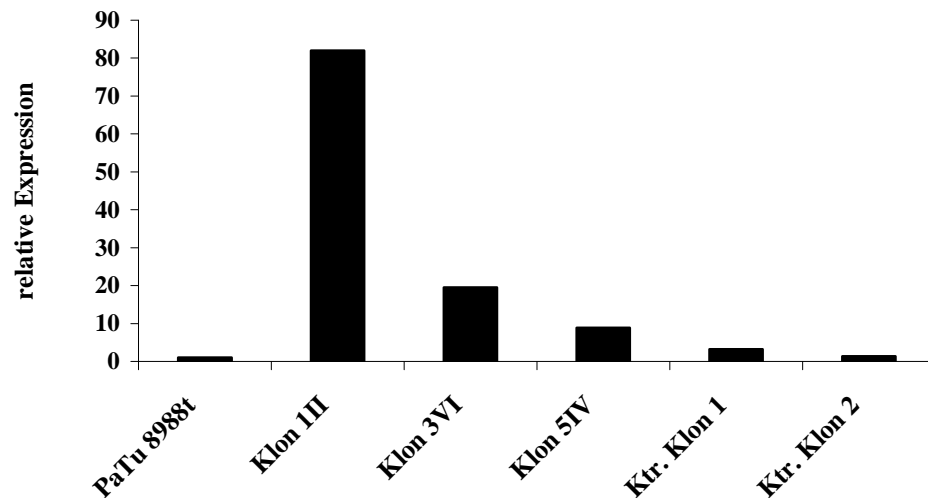
Da, wie schon anfangs erwähnt, die Transfektionseffizienz bei PaTu 8988t schlecht war, gingen aus diesen Versuchen nur sehr wenig stabil transfizierte Zellen hervor. Bei Kultivierung dieser Klone zu deren Vermehrung ergab sich außerdem das Problem, dass mit der Zeit bei vielen Zellen die Plasmide wieder verloren gingen, sodass keine reine Population mehr vorhanden war. Die Reinheit der Klone ließ sich hier leicht durch Überprüfung der Fluoreszenz kontrollieren.

Auch der Versuch erneuter Vereinzelungen des ursprünglichen Klon oder die Sortierung der Zellen mittels FACS (fluorescence **a**ctivated **c**ell **s**orting) führten nicht zum erwünschten Erfolg. So war es nicht möglich, eine ausreichende Anzahl verschiedener stabil transfizierter Klone auf diese Art und Weise zu produzieren.

Schlussendlich wurde dann der Ansatz der Doppeltransfektion zugunsten des pcDNA<sup>TM</sup>3.2/V5-DEST-Vektors verlassen. Die Klonierung der TFF1-Sequenz in diesen Vektor führt zur Herstellung von nativem TFF1 in transfizierten Zellen. Es wurden also keine Fusionsproteine mehr hergestellt. Des Weiteren sind die zur Selektion notwendigen Resistenzen bereits auf dem Vektor vorhanden. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz konnte hier allerdings nicht mehr die Fluoreszenz verwendet werden, sie musste mittels Western Blot oder PCR überprüft werden.

Dieser Ansatz wurde allein mit PaTu 8988t-Zellen verfolgt. Es konnten wesentlich bessere Ergebnisse erzielt werden.

Nach Kultivierung der Klone und Ermittlung der Stärke der TFF1-Expression durch RT-PCR wurden drei repräsentative Überexpressions-Klone sowie zwei mit dem Kontroll-Vektor transfizierte ausgewählt.



**Abbildung 10: Quantitative RT-PCR der Expressionsstärke von TFF1 in ausgewählten stabilen Klonen der Zelllinie PaTu 8988t**

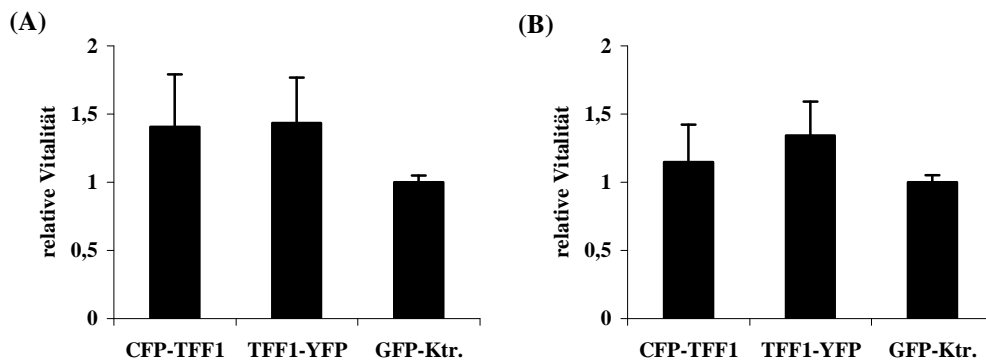
Die Klone wurden durch Transfektion mit dem pcDNA/V5-DEST-Vektor generiert, in welchen zuvor die TFF1-Sequenz kloniert worden war. Klon 1II zeigt die stärkste TFF1-Expression, gefolgt von Klon 3VI und Klon 5IV. Die Werte sind bezogen auf untransfizierte PaTu 8988t, die den Wert 1 erhielten und zum Vergleich mitgeführt wurden.

### 3.3 Effekte transienter TFF1-Überexpression in HEK-293

#### 3.3.1 Zellvitalität

Die physiologische Funktion von TFF1 beinhaltet die Unterstützung von Reparaturvorgängen der beschädigten Darmmukosa und schließt außerdem Effekte auf die Zellvitalität ein. Zu Beginn dieser Arbeit wurden daher zur orientierenden Untersuchung zunächst MTT-Assays durchgeführt. Diese Versuche sind relativ einfach und schnell durchzuführen, lassen jedoch, wie bereits erwähnt, nur einen Rückschluss auf den Anteil vitaler Zellen in einer Population zu. So können höhere Werte in Population A gegenüber Population B entweder auf eine gesteigerte Proliferation von A oder eine geringere Resistenz gegenüber schädlichen Faktoren von B zurückgeführt werden.

Die Versuche zeigten eine signifikant höhere Vitalität der TFF1-überexprimierenden Zellen bei HEK-293. Vor allem die freies TFF1 produzierenden YFP-transfizierten Zellen wiesen im Vergleich zu den mit der GFP-Kontrolle transfizierten erheblich höhere Werte auf.



**Abbildung 11: MTT-Assay transient transfizierter HEK-293**

- (D) 48 Stunden nach Transfektion. Die TFF1-transfizierten Zellpopulationen weisen eine signifikant höhere Vitalität auf. Die p-Werte ergeben für CFP-TFF1  $p = 4,72 \times 10^{-4}$ , für TFF1-YFP  $p = 3,61 \times 10^{-5}$ .
- (E) 72 Stunden nach Transfektion. Hier weisen nur noch die YFP-transfizierten Zellen eine höhere Vitalität auf. Die p-Werte ergeben für CFP-TFF1  $p = 0,092$ , für TFF1-YFP  $p = 2,55 \times 10^{-5}$ .

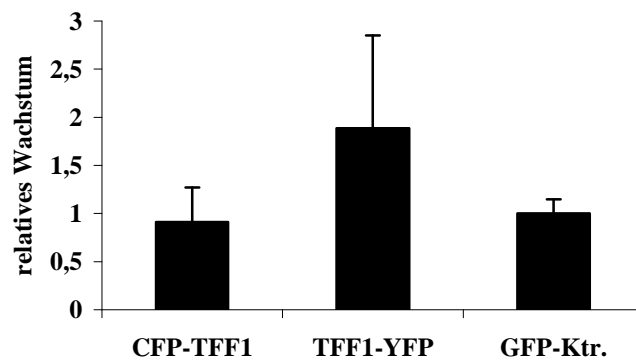
Die Werte sind relativ zu denen der Kontroll-transfizierten Zellen, welche als 1 gesetzt wurden.

### 3.3.2 Zellproliferation

Um zu untersuchen, ob die im MTT-Assay beobachteten positiven Effekte von TFF1 auf die Zellvitalität durch gesteigerte Proliferation zu erklären waren, wurde dies durch Einbau von BrdU in neu synthetisierte DNA und die anschließende Quantifizierung durch den Cell Proliferation ELISA überprüft.

Die Versuche wurden in verschiedenen Konstellationen durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen transfiziert und in normalem Kulturmedium mit einem FCS-Gehalt von 10 % kultiviert. Auch die Inkubation mit BrdU erfolgte in FCS-

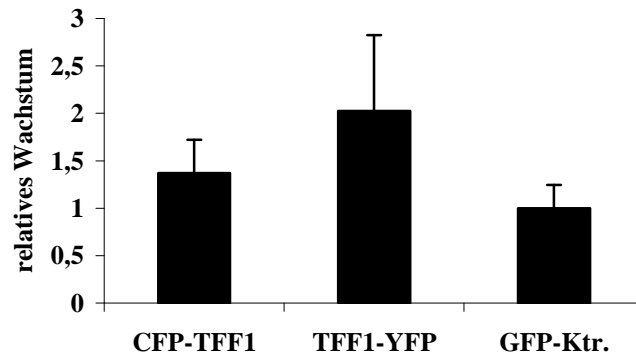
haltigem Medium. Hier zeigte sich, wiederum bei den mit dem YFP-Konstrukt transfizierten Zellen, eine signifikant höhere Proliferationsrate als in der Vergleichspopulation.



**Abbildung 12: Proliferation von TFF1-überexprimierenden HEK-293-Zellen im Cell Proliferation ELISA.**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in serumhaltigem Medium (10 % FCS). Es zeigt sich ein signifikant höheres Wachstum der YFP-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten. Als p-Werte ergeben sich für CFP-TFF1  $p = 0,075$ , für TFF1-YFP  $p = 4,36 \times 10^{-5}$ . Die Werte beziehen sich auf die der GFP-Kontrolle, welche den Wert 1 erhielt.

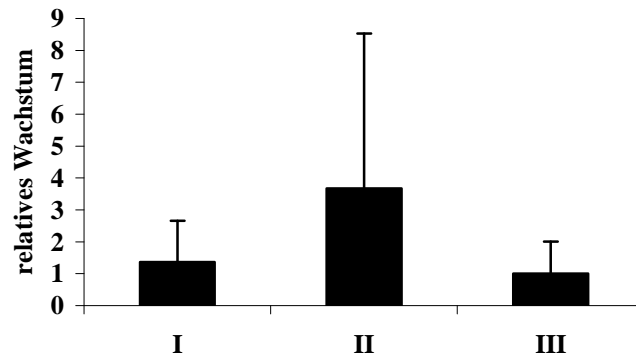
Um die eventuell durch den proliferationsfördernden Effekt des FCS verursachten Verzerrungen des Ergebnisses auszuschalten, wurden die Versuche erneut mit Kultivierung der Zellen in serumfreiem Medium durchgeführt. Auch hier konnte gezeigt werden, dass TFF1 die Proliferation signifikant positiv beeinflusst. Abermals war der Effekt bei mit dem YFP-Konstrukt transfizierten Zellen größer.



**Abbildung 13: Proliferation von TFF1-überexprimierenden HEK-293-Zellen im Cell Proliferation ELISA.**

Kultivierung in serumfreiem Medium. Auch hier zeigen die YFP-transfizierten Zellen ein signifikant höheres Wachstum. P-Werte für CFP-TFF1  $p = 9,44 \times 10^{-5}$ , für TFF1-YFP  $p = 6,45 \times 10^{-7}$ . Die Werte beziehen sich auf die der GFP-Kontrolle, welche den Wert 1 erhielt.

TFF1 ist ein Protein, welches seine Wirkung nicht nur innerhalb der Zelle entfaltet, sondern auch sezerniert wird und so seine Wirkung auf die Zellfunktion auto- oder parakrin ausüben kann. Um diese Effekte nachweisen zu können, wurden unbehandelte HEK-293-Zellen ausgesät und in konditioniertem Medium kultiviert. Das Medium stammte von zuvor mit den Überexpressions-Konstrukten transfizierten HEK-293-Zellen. Das Medium GFP-transfizierter Zellen diente zur Kontrolle. Auch hier wurde die Proliferation mittels Cell Proliferation ELISA überprüft. Erneut ließ sich zeigen, dass das freie TFF1, welches aus konditioniertem Medium YFP-transfizierter Zellen stammte, die Proliferation der Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant steigern kann.



**Abbildung 14: Proliferation von HEK-293 nach Kultivierung in TFF1-haltigem Medium**

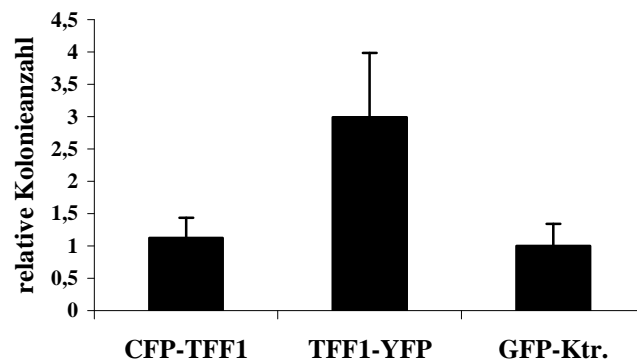
- (I) Medium von vormals CFP-TFF1-transfizierten Zellen;  $p = 0,284$ ;
- (II) Medium von vormals TFF1-YFP transfizierten Zellen; wiederum zeigen die Zellen hier ein signifikant höheres Wachstum;  $p = 0,009$ ;
- (III) Medium von mit der GFP-Kontrolle transfizierten Zellen.

Als Referenzwert diente der der GFP-Kontrolle.

### 3.3.3 Substratunabhängiges Wachstum

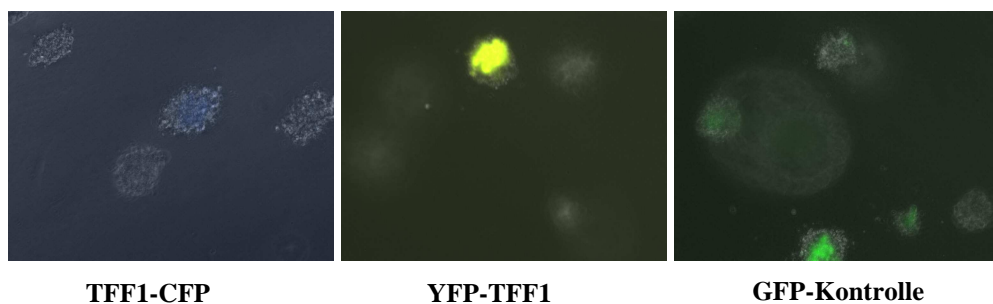
Ein weiterer Aspekt, der anhand der transienten Überexpression in HEK-293-Zellen untersucht wurde, ist der Einfluss von TFF1 auf das substratunabhängige Wachstum. Dieses wurde mit Hilfe des Soft-Agar-Assays untersucht.

Nach 7-tägigem Wachstum der Zellen ließ sich die Formation von Kolonien im Agar gut beurteilen. Es zeigte sich ein signifikant höheres Wachstum der YFP-transfizierten Zellen gegenüber denen der GFP-Kontrolle. Auch die CFP-transfizierten Zellen konnten besser Kolonien ausbilden als die der Kontrollgruppe.



**Abbildung 15: Substratunabhängiges Wachstum der TFF1-überexprimierenden HEK-293-Zellen**

Die YFP-transfizierten Zellen bilden wesentlich mehr Kolonien als die CFP-transfizierten und die der GFP-Kontroll-Gruppe. Die GFP-transfizierte Kontrollgruppe erhielt den Wert 1. Der p-Wert für CFP-TFF1 beträgt  $p = 0,005$ , der für TFF1-YFP  $p = 2,7 \times 10^{-46}$



**Abbildung 16: Koloniebildung von HEK-293 im Fluoreszenzmikroskop nach 7-tägigem Wachstum**

Es wachsen deutlich mehr Kolonien in der YFP-transfizierten Gruppe. Es lässt sich auch 7 Tage nach Transfektion teilweise eine noch starke Fluoreszenz erkennen.

### 3.4 Effekte von TFF1 auf das Verhalten stabil transfizierter PaTu 8988t-Zellen

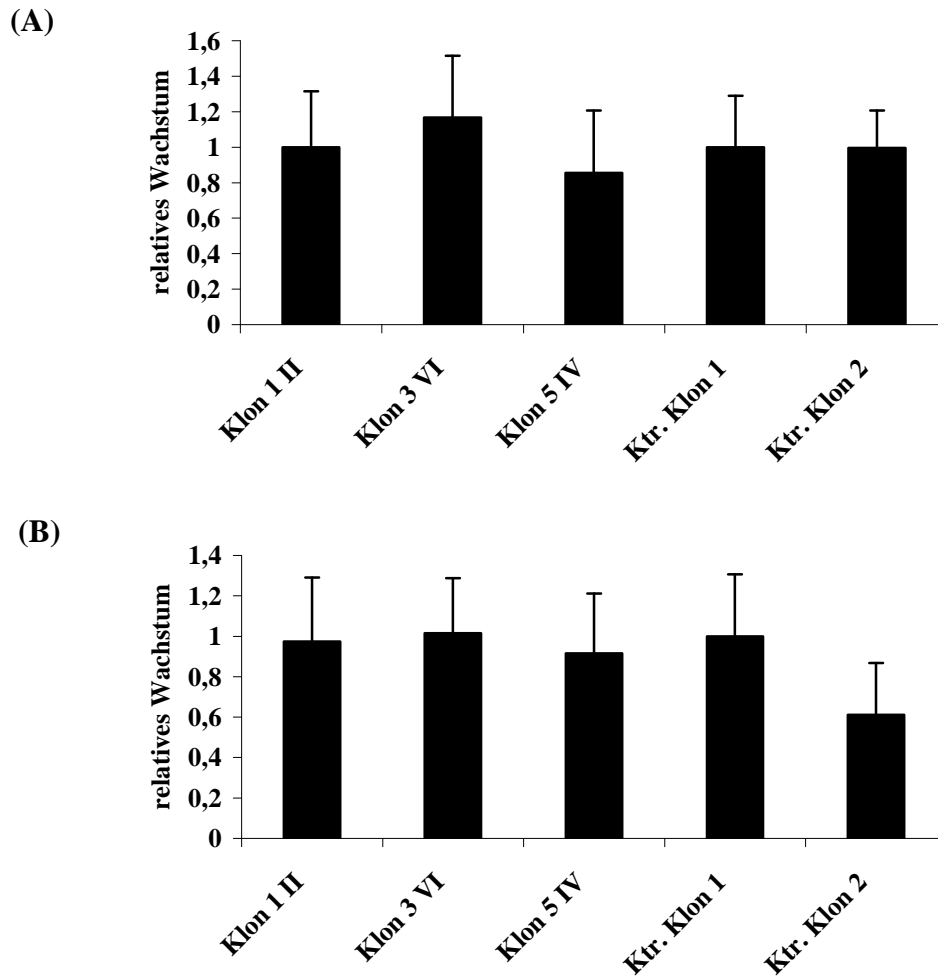
#### 3.4.1 Zellproliferation

Nachdem sich in den mit HEK-293-Zellen durchgeführten Experimenten ein proliferationsfördernder Effekt nachweisen ließ, wurden die Versuche mit stabil



transfizierten PaTu 8988t wiederholt. Es wurde ebenso der Cell Proliferation ELISA in FCS-haltigem und serumfreiem Medium durchgeführt.

Es zeigte sich in keinem der Versuche ein Einfluss von TFF1 auf das Proliferationsverhalten der Zellen.



**Abbildung 17: Proliferation von stabil transfizierten PaTu 8988t im Cell Proliferation ELISA**

(A) Kultivierung der Zellen in serumhaltigem Medium (10 % FCS).

(B) Kultivierung der Zellen in serumfreiem Medium.

Es ergeben sich keine einheitlichen oder signifikanten Unterschiede bei den Proliferationsraten. Ktr. Klon 1 wurde bei der Auswertung als 1 gesetzt.

TFF1 hat keinen signifikanten Einfluss auf das Proliferationsverhalten stabil transfizierter PaTu 8988t. Die Auswertung erfolgte unter Bezugnahme auf den Kontroll-Klon 1, welcher den Wert 1 erhielt.

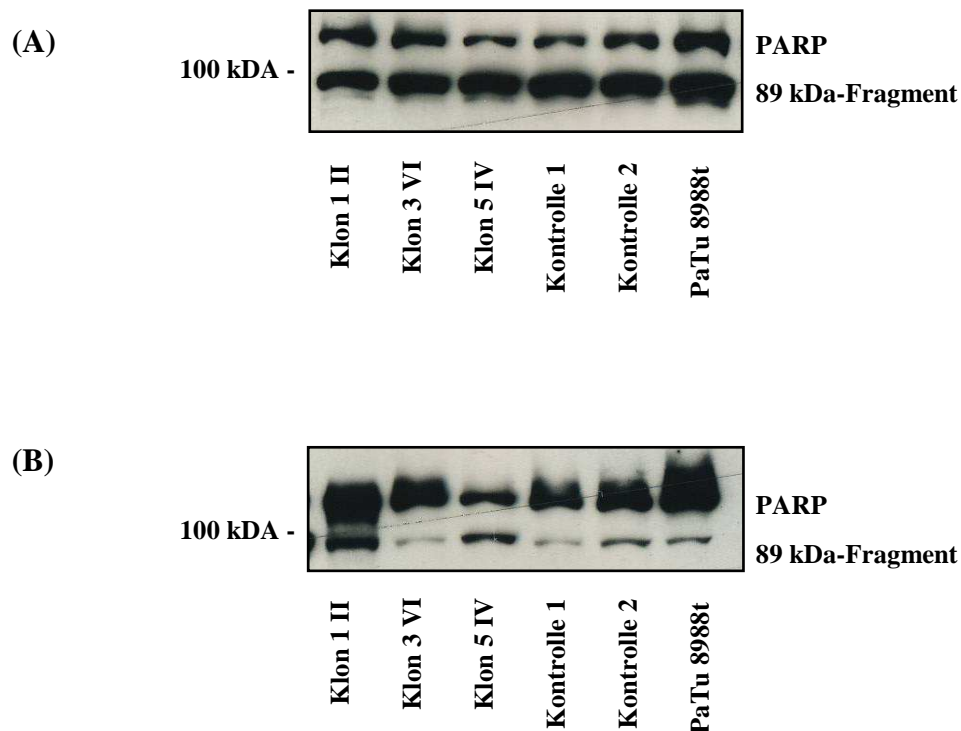
### 3.4.2 Induzierter Zelltod

Da die Vitalität einer Zellpopulation, wie sie im MTT-Assay gemessen wird, nicht nur von der Proliferationsrate, sondern auch von der Apoptoserate abhängt, wurden weiterführende Versuche zum induzierten Zelltod durchgeführt. Zur Stimulation der Apoptose wurden die Zellen mit TRAIL vorbehandelt. Die nötigen Konzentrationen waren im Vorfeld ermittelt worden.

Zunächst wurde der Cell death detection ELISA verwendet, um festzustellen, ob es Unterschiede in der Apoptoserate im Zusammenhang mit der Höhe der TFF1-Expression gab. Nachdem die ersten Experimente jedoch keine schlüssigen Ergebnisse lieferten, wurden diese Versuche nicht weitergeführt.

Eine weitere Möglichkeit des Nachweises apoptotischer Aktivität ist die Analyse der PARP-Spaltung im Western Blot. PARP ist ein an der Reparatur der DNA beteiligtes Enzym, welches im Zuge der Apoptose durch spezifische Proteasen gespalten wird. Bei einer hohen Apoptoserate liegen daher vermehrt PARP-Spaltprodukte vor, die im Western Blot identifiziert werden können. Die PARP-Spaltung tritt nur beim apoptotischen Zelltod auf und lässt somit eine eindeutige Unterscheidung zur Nekrose zu. Es entstehen Bruchstücke in einer Größe von 89 und 24 kDa. Das komplette Enzym hat eine Größe von 116 kDa.

Auch die Analyse der PARP-Spaltung erbrachte keine Hinweise auf einen Einfluss der TFF1-Expression auf die Empfindlichkeit der Zellen im Hinblick auf induzierten Zelltod. Der Versuch wurde nur einmalig durchgeführt.



**Abbildung 18: Western Blot Analyse der PARP-Spaltung stabil transfizierter PaTu 8988t**

- (A) Dieser Western Blot zeigt die Ergebnisse nach Behandlung der Zellen mit TRAIL. Es lässt sich keine einheitliche Tendenz in der Spaltung der Fragmente nachweisen.
- (B) Western Blot mit Analyse der PARP-Spaltung ohne vorherige Behandlung der Zellen mit TRAIL. Im Vergleich zu (A) erkennt man, dass weniger PARP gespalten und somit weniger Apoptose stattgefunden hat. TRAIL induziert also zuverlässig Apoptose in PaTu 8988t, TFF1 scheint jedoch weder die Apoptose zu fördern noch vor ihr zu schützen.
- (C) Proteinextrakte der nativen PaTu 8988t Zellen wurden zum Vergleich mitgeführt.

### 3.4.3 Substratunabhängiges Wachstum

Zur Untersuchung des Verhaltens der stabil transfizierten PaTu8988t im Zusammenhang mit substratunabhängigem Wachstum wurden ebenfalls Soft-Agar-Assays durchgeführt.

In mehrfachen Experimenten konnte kein Einfluss der TFF1-Expression auf die Koloniebildung der Zellen nachgewiesen werden.

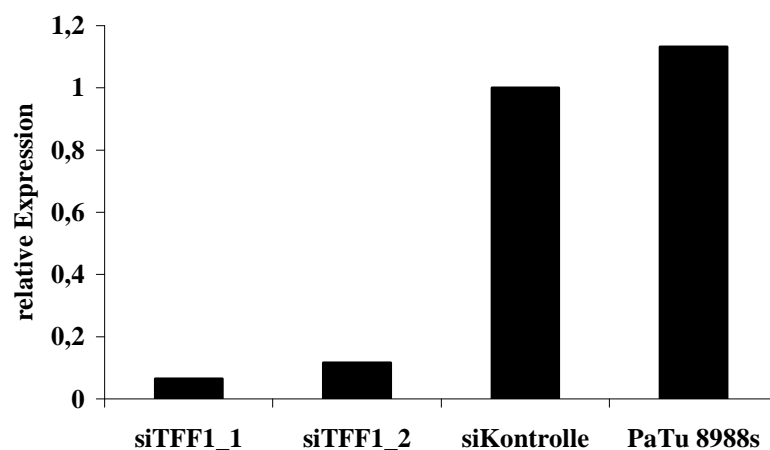
### 3.4.4 Zellmigration

Versuche zum Nachweis der Zellmigration wurden mit Hilfe eines Transwell-Assays durchgeführt. Um die Migration anzuregen, wurde ein FCS-Gradient erzeugt.

Die Anzahl der migrierten PaTu 8988t-Zellen zeigte keine Unterschiede im Zusammenhang mit der TFF1-Expression.

## 3.5 Genesilencing

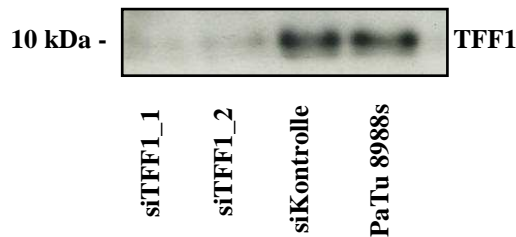
Aufgrund des hohen TFF1-Gehalts der PaTu 8988s-Zellen eigneten sich diese gut zur Downregulation der Expression durch siRNA und konsekutive Untersuchungen zum Einfluss des TFF1-Expressionslevels auf das Verhalten der Zellen. Es ließen sich gute Ergebnisse hinsichtlich der Repression der TFF1-Expression in PaTu 8988s-Zellen erzielen. Abbildungen 19 und 20 zeigen das Ergebnis 48 Stunden nach Transfektion. Die TFF1-Expression konnte auf unter 20 % der Expression in der Kontroll-transfizierten Vergleichspopulation gesenkt werden.



**Abbildung 19: Quantitative RT-PCR nach TFF1-Repression in PaTu 8988s**

Die TFF1-Expression ließ sich effizient und zuverlässig auf unter 20 % der Expression in der Kontrollgruppe senken. Zum Vergleich sind untransfizierte PaTu 8988s mitgeführt. Die Werte sind bezogen auf die der Kontrollgruppe, die den Wert 1 erhielt.

Diese Effekte ließen sich auf Proteinebene im Western Blot bestätigen.



**Abbildung 20: Western Blot-Analyse nach TFF1-Repression in PaTu 8988s**

Auch auf Proteinebene lässt sich die Unterdrückung der TFF1-Produktion durch Transfektion der siRNA nachweisen. Zum Vergleich sind wiederum untransfizierte PaTu 8988s mitgeführt.

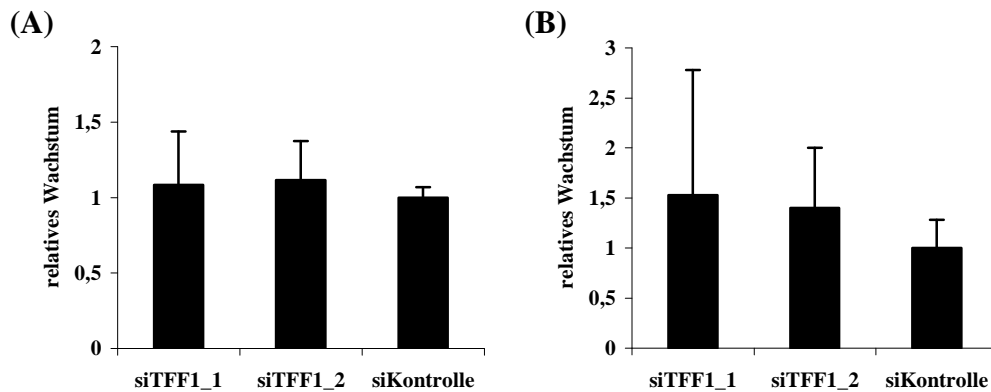
### 3.6 Effekte der Repression von TFF1 in PaTu 8988s-Zellen

#### 3.6.1 Zellproliferation

Um das Bild zu komplettieren, wurden Versuche zum Einfluss von TFF1 auf das Proliferationsverhalten von Pankreaskarzinomzellen auch mit der Zelllinie PaTu 8988s durchgeführt. Hier wurde die TFF1-Expression mit Hilfe von siRNA reprimiert. Die Versuche fanden ebenfalls sowohl unter serumhaltigen als auch unter serumfreien Bedingungen statt und wurden mit dem Cell Proliferation ELISA durchgeführt.

Bei Kultivierung der Zellen in serumhaltigem Medium konnte kein signifikanter Effekt der TFF1-Expression auf die Proliferation festgestellt werden.

Unter serumfreien Bedingungen zeigte sich allerdings interessanterweise, dass eine erniedrigte TFF1-Expression die Proliferation von PaTu 8988s fördert.



**Abbildung 21: Proliferation von PaTu 8988s bei TFF1-Repression im Cell Proliferation ELISA.**

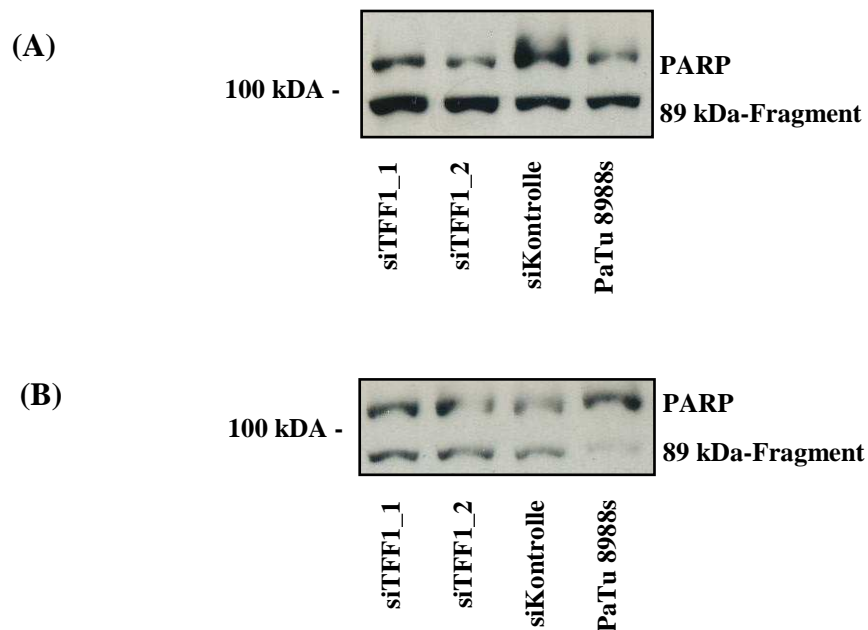
- (A) Kultivierung der Zellen in serumhaltigem Medium (10 % FCS). Die Unterschiede sind nicht signifikant. Als p-Werte ergeben sich bei siTFF1\_1  $p = 0,654$ , bei siTFF1\_2  $p = 0,175$
- (B) Kultivierung der Zellen in serumfreiem Medium. Hier zeigt sich eine signifikante Steigerung der Proliferation der mit TFF1-siRNA behandelten Zellen. Der P-Wert für siTFF1\_1 beträgt  $p = 0,037$ , für siTFF1\_2 ist  $p = 0,022$

### 3.6.2 Induzierter Zelltod

Komplementär zu den Untersuchungen hinsichtlich des induzierten Zelltodes mit stabil transfizierten PaTu 8988t wurden die gleichen Versuche auch nach Knock-down in der Zelllinie PaTu 8988s durchgeführt.

Auch hier zeigte der Cell death detection ELISA, dass TFF1 keinen Einfluss auf die Apoptose nach Behandlung der Zellen mit TRAIL zu haben scheint.

Die Analyse der PARP-Spaltung bestätigte die Ergebnisse des Cell Detection ELISA.



**Abbildung 22: Western Blot Analyse der PARP-Spaltung transient mit siRNA transfizierter PaTu 8988s**

(A) Nach Behandlung der Zellen mit TRAIL.

(B) Dieser Western Blot auf PARP-Spaltprodukte zeigt das Ergebnis ohne vorherige Behandlung der Zellen mit TRAIL.

Es lässt sich kein Einfluss von TFF1 auf das Verhalten der Zellen hinsichtlich des induzierten Zelltods erkennen. Proteinextrakte der nativen PaTu 8988s Zellen wurden zum Vergleich mitgeführt.

### 3.6.3 Substratunabhängiges Wachstum

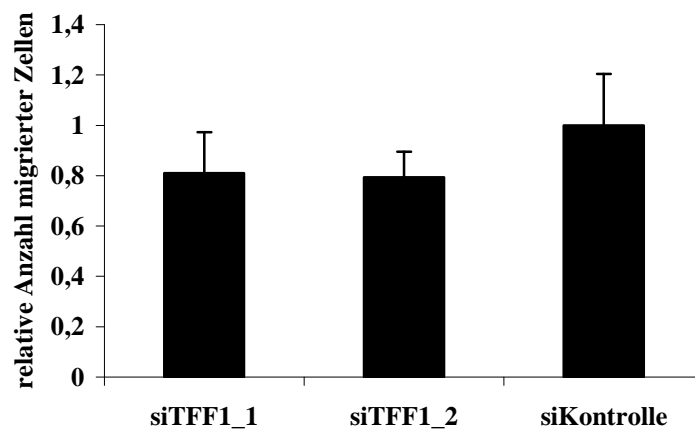
Das substratunabhängige Wachstum von PaTu 8988s wurde ebenfalls im Soft-Agar-Assay untersucht. Hier stellte die kompakte Morphologie der Zelllinie ein Problem dar. Auch nach mehrwöchigem Wachstum im Soft-Agar waren Einzelzellen im Lichtmikroskop kaum von Zellkolonien zu unterscheiden.

Aufgrund der beschriebenen Unsicherheiten bei der Auswertung wurde diese Versuchsreihe für PaTu 8988s nicht verwertet.

### 3.6.4 Zellmigration

Die Effekte von TFF1 auf die Migration von PaTu 8988s wurden mit einem Transwell-Assay entlang eines Serumgradienten untersucht.

Die Anzahl der migrierten Zellen war immer sehr klein. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Zellpopulationen, in denen TFF1 reprimiert worden war, konstant weniger migrierte Zellen aufwiesen als die der Kontrollgruppe.



**Abbildung 23: Relative Anzahl migrierter PaTu 8988s-Zellen im Transwell-Assay**

Die Zellen der Kontrollgruppe zeigten eine signifikant höhere Migrationsrate als diejenigen, in denen die TFF1-Expression unterdrückt wurde. Als p-Werte ergeben sich für siTFF1\_1  $p = 0,060$ , für siTFF1\_2  $p = 0,028$ . Die Werte beziehen sich auf die der siKontrolle, welche den Wert 1 erhielt.



## 4 Diskussion

Das Pankreaskarzinom gehört zu den aggressivsten Krebserkrankungen, die wir kennen. Zu den Aspekten der Malignität gehören Faktoren, die z. B. Migration und Proliferation fördern sowie die Apoptose behindern.

Ähnliche Funktionen sind bereits für die Trefoil Faktoren beschrieben worden. Darüber hinaus konnte mehrfach beobachtet werden, dass TFF1 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas und seinen Vorläuferläsionen überexprimiert wird.

In dieser Arbeit wurde nun erstmals untersucht, ob TFF1 eine funktionelle Rolle in der Entstehung des Pankreaskarzinoms spielt.

### 4.1 Einfluss von TFF1 auf das Verhalten verschiedener Zelllinien *in vitro*

#### 4.1.1 Einfluss von TFF1 auf die Zellvitalität

Es ist bereits beschrieben worden, dass TFF1 auf verschiedene gastrointestinale Zelllinien einen anti-proliferativen Effekt hat [122, 8, 12]. Dies scheint unter anderem durch eine Verzögerung des Übergangs von G1 zu S-Phase zu geschehen, eines oft auch im Pankreaskarzinom durch Mutation gestörten Vorgangs [8, 38]. Gegensätzliche Beobachtungen - eine erhöhte Zellproliferation und gesteigertes Zellüberleben - konnten in Mammakarzinomzelllinien gemacht werden [1].

In dieser Arbeit konnte ebenfalls eine sowohl proliferationsfördernde als auch eine proliferationshemmende Wirkung von TFF1 beobachtet werden. Zunächst konnte gezeigt werden, dass TFF1 zu einer erhöhten Zellvitalität der transient TFF1-überexprimierenden HEK-293-Zellen führt. In weiterführenden Proliferationsassays hatte TFF1 einen signifikant proliferationsfördernden Einfluss auf die transient transfizierten HEK-293-Zellen. Dieser pro-proliferative Effekt ließ sich unter verschiedenen Bedingungen bestätigen. Auch exogen zugeführtes TFF1 führte zu einer gesteigerten Proliferation bei HEK-293-Zellen.

Interessanterweise zeigte sich bei Durchführung des gleichen Proliferationsassays mit PaTu 8988s eine höhere Proliferationsrate bei mit siRNA-transfizierten Zellen. Hier proliferierten also die Zellen, denen mehr TFF1 zur Verfügung stand, schlechter. Bei Versuchen zur Proliferation mit stabil transfizierten PaTu 8988t-Zellen konnte kein Effekt von TFF1 auf das Proliferationsverhalten festgestellt werden.

Sowohl in der Literatur als auch bei den von uns ausgeführten Versuchen kann also keine einheitliche Aussage dazu getroffen werden, ob TFF1 generell einen pro- oder antiproliferativen Effekt besitzt. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass bislang noch unbekannte und nicht untersuchte Faktoren in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen.

Unsere Versuche könnten zunächst den Verdacht nahe legen, dass TFF1 verschiedene Effekte auf maligne oder nicht maligne Zellen besitzt. Bei HEK-293 handelt es sich z. B. um eine zwar immortalisierte aber nicht maligne transformierte Zelllinie, die aus der embryonalen Niere stammt. PaTu 8988s dagegen ist eine Karzinomzelllinie des Pankreas, also maligne. Betrachtet man nun aber wiederum die Ergebnisse aus der Literatur, ließe sich dieser Verdacht nicht bestätigen. Hier zeigten Mammakarzinomzellen eine gesteigerte und epitheliale Zellen aus Magen und Dünndarm eine verringerte Proliferation unter TFF1 Einfluss.

Die Tatsache, dass HEK-293-Zellen sowohl bei endogener TFF1-Produktion als auch nach exogen zugeführtem TFF1 eine gesteigerte Proliferation zeigten, legt nahe, dass der Effekt auch nicht von der Art der Administration abhängt.

Denkbar wäre allerdings noch, dass die Wirkung von TFF1 von der Art des Ursprungsgewebes der Zellen abhängig ist. Möglicherweise werden daher direkt unterschiedliche Signalwege angesprochen. Da über die Signaltransduktion der TFFs noch sehr wenig bekannt ist, kann darüber bislang keine Aussage getroffen werden.

Ein weiterer Faktor, der die Zellvitalität beeinflusst, ist die Bereitschaft der Zelle zur Apoptose. Für die bereits oben erwähnten gastrointestinalen Zelllinien konnte

zusätzlich zum anti-proliferativen Effekt von TFF1 auch ein anti-apoptotischer nachgewiesen werden [122, 8].

Im Gegensatz dazu legen unsere Ergebnisse nahe, dass TFF1 keinen Einfluss auf das Apoptoseverhalten von Pankreaskarzinomzellen hat.

#### 4.1.2 Einfluss von TFF1 auf das Migrationsverhalten

Der Erwerb der Migrationsfähigkeit ist ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Metastasierung eines epithelialen Tumors. Promigratorische Eigenschaften sind für TFF1 bereits beschrieben worden [1, 78, 122]. Wir konnten diesen Effekt ebenfalls für die Zelllinie PaTu 8988s beobachten. Hier migrierten signifikant weniger Zellen, sobald vorher die TFF1-Expression mittels siRNA reprimiert wurde.

Verzerrungen des Ergebnisses durch Proliferation der schon migrierten Zellen sind sehr unwahrscheinlich, da die Zeitspanne, die den Zellen zur Migration gegeben wurde, sehr kurz war. Allerdings migrierte nur eine sehr geringe absolute Zahl der Zellen, was bedeutet, dass das System sehr anfällig für kleinste Veränderungen ist.

Während sich in den Knock-down-Versuchen ein einheitliches Bild zeigte, kann dies für die Überexpressionversuche nicht gesagt werden. Bei Letzteren ergaben sich sehr unterschiedliche Ergebnisse, welche eine Aussage über die Beeinflussung des Migrationsverhaltens durch TFF1 hier nicht möglich machen.

#### 4.1.3 Einfluss von TFF1 auf substratunabhängiges Wachstum

Versuche zum substratunabhängigen Wachstum untersuchen die Fähigkeit einer Zelle zu proliferieren, auch wenn die dazu eigentlich benötigte Interaktion mit anderen Zellen bzw. der extrazellulären Matrix verloren gegangen ist. Dies ist ein weiterer wichtiger Schritt zur Etablierung einer Tumormetastase.

Die Zelllinie HEK-293 zeigte in diesem Zusammenhang eine signifikante Zunahme der Koloniezahl bei TFF1-Überexpression im Soft-Agar-Assay und somit eine gesteigerte Fähigkeit zu substratunabhängigem Wachstum. Ein gesteigertes substratunabhängiges Wachstum bei TFF-Überexpression konnte bereits für MCF-7- und PC/AA/C1-Zellen gezeigt werden [1, 88].

Erstaunlich ist hier, dass die Zellen der GFP-transfizierten Kontrollgruppe überhaupt Kolonien bilden konnten. Eigentlich müssten diese nicht maligne transformierten Zellen bei Verlust der Zell-Zell-Kontakte in Anoikis gehen. Ein Erklärungsansatz könnte sein, dass sich während der Kultivierung der Zellen unbemerkt Mutationen eingeschlichen haben, die diese weniger anfällig für den Verlust der Zell-Zell-Kontakte machen.

Aufgrund der nachfolgend näher beschriebenen Probleme bei der Versuchsauswertung der Zelllinie PaTu 8988s kann keine Aussage zum Verhalten im Soft-Agar-Assay getroffen werden. Da sich aber auch keine Effekte bei stabil transfizierten PaTu 8988t feststellen ließen, scheint TFF1 eher keinen Einfluss auf das substratunabhängige Wachstum der Pankreaskarzinomzellen zu haben.

#### 4.1.4 Anmerkungen zur Methodik

Generell sollte erwähnt werden, dass die bereits beschriebene besondere Morphologie der Zelllinie PaTu 8988s die Versuchsdurchführung teilweise durchaus erschwerte. Vor allem die Tatsache, dass die Unterscheidung zwischen Einzelzellen und einem Verband aus mehreren Zellen nicht leicht ist, kann auch bei größtmöglicher Sorgfalt zur Verzerrung der Zellzahlbestimmung führen. Ebenso ist die Zugänglichkeit der Zellen für die verschiedenen verwendeten Chemikalien schlechter als bei anderen Zelllinien. Inkubationszeiten wurden so weit möglich angepasst, es lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass auch hier Verzerrungen aufgetreten sind.

Die Arbeit mit stabil transfizierten Zellklonen birgt immer die Gefahr klonaler Artefakte, d. h., dass sich außer der gewünschten genetischen Veränderung auch noch weitere unbemerkte Änderungen eingeschlichen haben. Diese könnten ebenso das Verhalten der Zelle ändern und würden als Effekt der gewünschten genetischen Veränderung zugeschrieben. Dem wurde entgegengewirkt, indem immer mehrere Klone ausgewählt wurden. Auszuschließen sind solche Effekte dennoch nicht

völlig. Wünschenswert wäre in diesem Zusammenhang allerdings auch eine Durchführung der Versuche mit transient transfizierten PaTu 8988t gewesen, da dort klonale Effekte ausgeschlossen sind. Dies war jedoch aufgrund der bereits erwähnten schlechten Transfektionseffizienz nicht möglich.

Auffällig ist ebenfalls die Tatsache, dass im Rahmen der an HEK-293 durchgeführten Versuche mit den GFP-abgeleiteten Überexpressionsvektoren nachweisbare Effekte fast immer sehr viel stärker bei mit dem YFP-Konstrukt transfizierten Zellen zu beobachten waren. Ein möglicher Grund dafür kann sicherlich die bereits beschriebene Produktion des nativen TFF1-Proteins durch das YFP-Konstrukt sein. Das würde bedeuten, dass generell TFF1-Fusionsproteine eine geringe Wirkung zeigen. Eventuell könnte dies aber auch mit der N-terminalen Fusion des CFP-Proteins an TFF1 zusammenhängen. TFF1 ist ein sezerniertes Protein. Bei sezernierten Proteinen sitzt das Signalpeptid für die Sekretion ebenfalls N-terminal. Es wäre also denkbar, dass durch die N-terminale Fusion von CFP an TFF1 die Lokalisation des fertigen Proteins fehlerhaft stattfindet und TFF1 daher möglicherweise nicht auf den üblichen Wegen wirken kann. Ähnliche Annahmen äußerten bereits Simpson et al. für andere Proteine [96].

## 4.2 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurden erstmals Untersuchungen zum funktionellen Einfluss von TFF1 im Pankreaskarzinom durchgeführt. In unseren Versuchen gibt es Hinweise auf eine Beeinflussung des Verhaltens von Pankreaskarzinomzellen durch TFF1 und eine potentielle Rolle in der Tumorprogression. So wird durch eine TFF1-Repression in PaTu 8988s die Migrationsfähigkeit der Zellen erhöht und die Proliferation gehemmt. Eine Überexpression in der normalerweise gering TFF1 exprimierenden Zelllinie PaTu 8988t scheint keinen Einfluss auf das Verhalten der Zellen zu haben.

Parallel dazu ließen sich einige interessante Effekte auf die epitheliale Zelllinie HEK-293 nachweisen. Hier konnte TFF1 die Proliferation und das substratunabhängige Wachstum fördern, was für ein onkogenes Potential von TFF1 spricht.

Um die funktionelle Rolle von TFF1 im Pankreaskarzinom besser verstehen zu können, sind allerdings noch weitere Untersuchungen nötig.

### 4.3 Ausblick

Ergänzend zu dieser Arbeit wäre es zunächst sinnvoll, einige weiterführende Untersuchungen vorzunehmen.

Ein Ansatz wären Versuche zum invasiven Verhalten von Pankreaskarzinomzelllinien unter TFF1-Einfluss. In diesem Zusammenhang werden auch *in vivo*-Versuche in der Maus interessant. Diese sind auf der Grundlage dieser Arbeit bereits in der Arbeitsgruppe geplant.

Eine weitere Möglichkeit, das Wissen über TFF1 im Pankreaskarzinom zu erweitern, wäre die Durchführung ähnlicher Versuche an weiteren Pankreaskarzinomzelllinien. Darunter könnten vor allem auch Zellen muzinöser Tumoren von Interesse sein, da TFF1 gemeinsam mit Muzinen sezerniert wird und sich daraus noch zusätzliche, bislang wenig beachtete, Interaktionen ergeben könnten. Ein weiterer Grund für die Untersuchung von TFF1 in muzinösen Tumoren ist die Tatsache, dass eine starke TFF1-Expression in muzinösen Pankreastumoren nachgewiesen werden konnte [66, 103, 120].

Generell aufschlussreich wäre es, die Ursachen der verschiedenen Effekte von TFF1 auf die Proliferation der Zellen näher zu untersuchen. Zu diesem Zweck würden sich Versuche mit den verschiedensten Zelllinien eignen. Außerdem wäre es natürlich sinnvoll, die Signalwege und Rezeptoren, mit denen TFF1 interagiert, näher zu beleuchten.

Ein weiterer wenig beachteter Aspekt ist auch die Tatsache, dass TFF1 ein sezerniertes Protein ist. Wir konnten anhand der Experimente zur Proliferation mit HEK-293-Zellen zeigen, dass auch exogen zugeführtes TFF1 die Proliferation fördert. Es wäre interessant zu wissen, ob es einen Unterschied zwischen auto- oder parakrinen Wirkungen von TFF1 gibt. In diesem Zusammenhang könnte auch untersucht werden, inwieweit TFF1 die Interaktionen von Tumor- und Stromazellen beeinflusst, welche ja insbesondere beim Pankreaskarzinom eine bedeutende Rolle spielen.

Grundsätzlich wird die Klärung der Rolle aller Trefoil Faktoren in der Tumorentstehung spannend bleiben. Dies gilt vor allem für TFF1, für welches bislang malignitätsfördernde und auch tumorsupprimierende Wirkungen nachgewiesen werden konnten.

Langfristig könnten sogar mögliche therapeutische Nutzen der Trefoil Faktoren oder eine Funktion als diagnostische Marker in der Früherkennung von Malignomen oder Metastasen denkbar sein.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Trefoil Faktoren noch viele Fragen aufwerfen und weiterhin ein spannendes Feld der Forschung darstellen. Vor allem die Klärung ihrer Rolle in der Tumorentstehung sowie mögliche klinische und therapeutische Implikationen machen sie zu einem wichtigen Forschungsgegenstand.



## 5 Zusammenfassung

Die Familie der Trefoil Faktoren umfasst drei kleine, proteasestabile Proteine. Sie sind maßgeblich an der Restitution des Gastrointestinaltraktes beteiligt und beeinflussen somit unter anderem Prozesse der Migration und Apoptose. Es konnte gezeigt werden, dass ein Mitglied dieser Familie, der Trefoil Factor 1 (TFF1) im dukталen Adenokarzinom des Pankreas und dessen Vorläuferläsionen überexprimiert wird. In dieser Arbeit wird erstmals die funktionelle Bedeutung von TFF1 im Pankreaskarzinom untersucht.

Hierzu wurde zunächst mit PaTu 8988s und PaTu 8988t ein Pankreaskarzinom-Zelllinienpaar identifiziert, dessen einer Partner eine hohe, der andere eine niedrige TFF1-Expression aufweist. In diesen Zelllinien wurde TFF1 entweder durch siRNA reprimiert oder mit Hilfe von Überexpressionskonstrukten überexprimiert. Anschließend wurde das Verhalten der Zellen in Abhängigkeit der TFF1-Expression in verschiedenen *in vitro*-Versuchen zu Proliferation, Apoptose, Migration und substratunabhängigem Wachstum untersucht.

Es zeigte sich, dass TFF1 eine promigratorische und antiproliferative Wirkung auf die Pankreaskarzinomzellen ausübt.

Parallel wurden die gleichen Versuche an transient TFF1-überexprimierenden HEK-293-Zellen durchgeführt. Bei diesen nicht maligne transformierten Zellen aus der embryonalen Niere förderte TFF1 die Proliferation sowie das substratunabhängige Wachstum.

TFF1 scheint also das onkogene Potenzial von Pankreaskarzinomzellen zu unterstützen und auch epithelialen Zellen onkogene Eigenschaften zu verleihen. Interessanterweise zeigten sich jedoch gegensätzliche Ergebnisse hinsichtlich der Proliferation in den unterschiedlichen Zelllinien.

Weiterführende Untersuchungen müssen diese Zusammenhänge klären und weitere Aspekte malignen Wachstums, wie z. B. den Einfluss auf Invasivität, prüfen.

## 6 Abstract

The Trefoil Factor Family consists of three small, protease-resistant proteins which play a crucial role in the restitution of the gastrointestinal tract. In this context, they influence such important processes as migration and apoptosis. So far, it could be shown that one member of this family, the Trefoil Factor 1 (TFF1), is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and its precursor lesions. For the first time, this study examines the functional role of TFF1 in pancreatic cancer. During the search for a pair of cell lines in which one partner shows a high and the other one a low TFF1-expression, PaTu 8988s and PaTu 8988t were identified. In the following experiments, the influence of TFF1 on proliferation, apoptosis, migration and anchorage-independent cell growth was tested. TFF1 expression was altered by either suppressing TFF1 by siRNA transfection or stable overexpression of TFF1.

As a result, it was observed that TFF1 has a pro-migratory and anti-proliferative effect on pancreatic carcinoma cell lines.

At the same time, similar experiments were conducted with HEK-293-cells which transiently overexpressed TFF1. In this cell lineage, deriving from human embryonic kidney, TFF1 enhances proliferation and anchorage-independent growth.

In summary, it can be said that TFF1 seems to support the oncogenic potential of human pancreatic carcinoma cells. Interestingly, it could be shown that TFF1 has different effects on proliferation in different cell lines.

Further research has to be conducted to elucidate those findings. Furthermore, other aspects of malignant growth, like effects on invasion, should be examined.

## 7 Literaturverzeichnis

- 1 Amiry N, Kong X, Muniraj N et al. Trefoil factor-1 (TFF1) enhances oncogenicity of mammary carcinoma cells. *Endocrinology*. 2009; 150:4473-83.
- 2 Bachem MG, Schunemann M, Ramadani M et al. Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology*. 2005; 128:907-21.
- 3 Bachem MG, Zhou S, Buck K, Schneiderhan W, Siech M. Pancreatic stellate cells - role in pancreas cancer. *Langenbecks Arch Surg*. 2008; 393:891-900.
- 4 Balleine RL, Clarke CL. Expression of the oestrogen responsive protein pS2 in human breast cancer. *Histol Histopathol*. 1999; 14:571-8.
- 5 Barkhem T, Haldosen L, Gustafsson J, Nilsson S. pS2 Gene expression in HepG2 cells: complex regulation through crosstalk between the estrogen receptor alpha, an estrogen-responsive element, and the activator protein 1 response element. *Mol Pharmacol*. 2002; 61:1273-83.
- 6 Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A et al. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*. 2003; 425:846-51.
- 7 Blanchard C, Durual S, Estienne M et al. IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression: requirement for STAT6 and de novo protein synthesis. *J Immunol*. 2004; 172:3775-83.
- 8 Bossenmeyer-Pourie C, Kannan R, Ribieras S et al. The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis. *J Cell Biol*. 2002; 157:761-70.

- 9 Buchholz M, Kestler HA, Holzmann K et al. Transcriptome analysis of human hepatic and pancreatic stellate cells: organ-specific variations of a common transcriptional phenotype. *J Mol Med.* 2005; 83:795-805.
- 10 Buchholz M, Braun M, Heidenblut A et al. Transcriptome analysis of microdissected pancreatic intraepithelial neoplastic lesions. *Oncogene.* 2005; 24:6626-36.
- 11 Caldas C, Hahn SA, da Costa LT et al. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet.* 1994; 8:27-32.
- 12 Calnan DP, Westley BR, May FE, Floyd DN, Marchbank T, Playford RJ. The trefoil peptide TFF1 inhibits the growth of the human gastric adenocarcinoma cell line AGS. *J Pathol.* 1999; 188:312-7.
- 13 Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4:118-32.
- 14 Chadwick MP, Westley BR, May FE. Homodimerization and hetero-oligomerization of the single-domain trefoil protein pNR-2/pS2 through cysteine 58. *Biochem J.* 1997; 327 ( Pt 1):117-23.
- 15 Clyne M, Dillon P, Daly S et al. Helicobacter pylori interacts with the human single-domain trefoil protein TFF1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:7409-14.
- 16 Collier JD, Bennett MK, Bassendine MF, Lendrum R. Immunolocalization of pS2, a putative growth factor, in pancreatic carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 1995; 10:396-400.
- 17 Dignass A, Lynch-Devaney K, Kindon H, Thim L, Podolsky DK. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. *J Clin Invest.* 1994; 94:376-83.

- 18 Ellenrieder V, Schneiderhan W, Bachem M, Adler G. Fibrogenesis in the pancreas. *Rocz Akad Med Bialymst.* 2004; 49:40-6.
- 19 Elsasser HP, Lehr U, Agricola B, Kern HF. Establishment and characterisation of two cell lines with different grade of differentiation derived from one primary human pancreatic adenocarcinoma. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1992; 61:295-306.
- 20 Emami S, Le Floch N, Bruyneel E et al. Induction of scattering and cellular invasion by trefoil peptides in src- and RhoA-transformed kidney and colonic epithelial cells. *FASEB J.* 2001; 15:351-61.
- 21 Emami S, Rodrigues S, Rodrigue CM et al. Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression. *Peptides.* 2004; 25:885-98.
- 22 FitzGerald AJ, Pu M, Marchbank T et al. Synergistic effects of systemic trefoil factor family 1 (TFF1) peptide and epidermal growth factor in a rat model of colitis. *Peptides.* 2004; 25:793-801.
- 23 Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC et al. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology.* 2000; 119:1447-53.
- 24 Gillesby BE, Zacharewski TR. pS2 (TFF1) levels in human breast cancer tumor samples: correlation with clinical and histological prognostic markers. *Breast Cancer Res Treat.* 1999; 56:253-65.
- 25 Goggins M, Schutte M, Lu J et al. Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas. *Cancer Res.* 1996; 56:5360-4.
- 26 Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977; 36:59-74.

- 27     Graness A, Chwieralski CE, Reinhold D, Thim L, Hoffmann W. Protein kinase C and ERK activation are required for TFF-peptide-stimulated bronchial epithelial cell migration and tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secretion. *J Biol Chem.* 2002; 277:18440-6.
- 28     Hanby AM, Wright NA. The ulcer-associated cell lineage: the gastrointestinal repair kit? *J Pathol.* 1993; 171:3-4.
- 29     Henry JA, Bennett MK, Piggott NH, Levett DL, May FE, Westley BR. Expression of the pNR-2/pS2 protein in diverse human epithelial tumours. *Br J Cancer.* 1991; 64:677-82.
- 30     Hoffmann W, Jagla W, Wiede A. Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain. *Histol Histopathol.* 2001; 16:319-34.
- 31     Hoffmann W. Trefoil factors TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62:2932-8.
- 32     Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2000; 6:2969-72.
- 33     Hruban RH, Iacobuzio-Donahue C, Wilentz RE, Goggins M, Kern SE. Molecular pathology of pancreatic cancer. *Cancer J.* 2001; 7:251-8.
- 34     Hruban RH, Wilentz RE, Kern SE. Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am J Pathol.* 2000; 156:1821-5.
- 35     Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ et al. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol.* 1993; 143:545-54.

- 36 Jackerott M, Lee YC, Mollgard K et al. Trefoil factors are expressed in human and rat endocrine pancreas: differential regulation by growth hormone. *Endocrinology*. 2006; 147:5752-9.
- 37 Jakowlew SB, Breathnach R, Jeltsch JM, Masiakowski P, Chambon P. Sequence of the pS2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Nucleic Acids Res*. 1984; 12:2861-78.
- 38 Jones S, Zhang X, Parsons DW et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*. 2008; 321:1801-6.
- 39 Joo Y, Rew J, Park C, Kim S. Expression of E-cadherin, alpha- and beta-catenins in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology*. 2002; 2:129-37.
- 40 Katoh M. Trefoil factors and human gastric cancer (review). *Int J Mol Med*. 2003; 12:3-9.
- 41 Kinoshita K, Taupin DR, Itoh H, Podolsky DK. Distinct pathways of cell migration and antiapoptotic response to epithelial injury: structure-function analysis of human intestinal trefoil factor. *Mol Cell Biol*. 2000; 20:4680-90.
- 42 Kirby RE, Lewandrowski KB, Southern JF, Compton CC, Warshaw AL. Relation of epidermal growth factor receptor and estrogen receptor-independent pS2 protein to the malignant transformation of mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Arch Surg*. 1995; 130:69-72.
- 43 Kjellek S, Nexø E, Thim L, Poulsen SS. Systemically administered trefoil factors are secreted into the gastric lumen and increase the viscosity of gastric contents. *Br J Pharmacol*. 2006; 149:92-9.
- 44 Kjellek S. The trefoil factor family - small peptides with multiple functionalities. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66:1350-69.

- 45 Kloppel G, Lingenthal G, von Bulow M, Kern HF. Histological and fine structural features of pancreatic ductal adenocarcinomas in relation to growth and prognosis: studies in xenografted tumours and clinico-histopathological correlation in a series of 75 cases. *Histopathology*. 1985; 9:841-56.
- 46 Koninger J, Giese T, di Mola FF et al. Pancreatic tumor cells influence the composition of the extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 322:943-9.
- 47 Kouznetsova I, Laubinger W, Kalbacher H et al. Biosynthesis of gastrokine-2 in the human gastric mucosa: restricted spatial expression along the antral gland axis and differential interaction with TFF1, TFF2 and mucins. *Cell Physiol Biochem*. 2007; 20:899-908.
- 48 Lefebvre O, Chenard MP, Masson R et al. Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science*. 1996; 274:259-62.
- 49 Longman RJ, Douthwaite J, Sylvester PA et al. Coordinated localisation of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. *Gut*. 2000; 47:792-800.
- 50 Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G et al. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med*. 1993; 328:1433-7.
- 51 Lynch SM, Vrieling A, Lubin JH et al. Cigarette smoking and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium. *Am J Epidemiol*. 2009; 170:403-13.
- 52 Madsen J, Nielsen O, Tornøe I, Thim L, Holmskov U. Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3. *J Histochem Cytochem*. 2007; 55:505-13.



- 53 Maitra A, Adsay NV, Argani P et al. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol*. 2003; 16:902-12.
- S. 3: With kind permission from Springer Science+Business Media: *Mod Pathol*. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. Maitra A et al. 2003; 16:902-12. Figure 3
- 54 Marchbank T, Westley BR, May FE, Calnan DP, Playford RJ. Dimerization of human pS2 (TFF1) plays a key role in its protective/healing effects. *J Pathol*. 1998; 185:153-8.
- 55 Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, Fishman MC. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science*. 1996; 274:262-5.
- 56 Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, Gannon F, Krust A, Chambon P. Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res*. 1982; 10:7895-903.
- 57 Mathelin C, Tomasetto C, Rio M. Le facteur en trefle 1 (pS2/TFF1), un peptide aux multiples facettes. *Bull Cancer*. 2005; 92:773-81.
- 58 May FE, Griffin SM, Westley BR. The trefoil factor interacting protein TFIZ1 binds the trefoil protein TFF1 preferentially in normal gastric mucosal cells but the co-expression of these proteins is deregulated in gastric cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009; 41:632-40.
- 59 Merl MY, Li J, Saif MW. The first-line treatment for advanced pancreatic cancer. Highlights from the '2010 ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium'. Orlando, FL, USA. January 22-24, 2010. *JOP*. 2010; 11:148-50.

- 60 Mihaljevic AL, Michalski CW, Friess H, Kleeff J. Molecular mechanism of pancreatic cancer - understanding proliferation, invasion, and metastasis. *Langenbecks Arch Surg.* 2010; 395:295-308.
- S. 3: With kind permission from Springer Science+Business Media: *Langenbecks Arch Surg.* Molecular mechanism of pancreatic cancer - understanding proliferation, invasion, and metastasis. 2010; 395:295-308. Mihaljevic AL et al. Figure 1 a
- 61 Morgan KA, Adams DB. Solid tumors of the body and tail of the pancreas. *Surg Clin North Am.* 2010; 90:287-307.
- 62 Murphy KM, Brune KA, Griffin C et al. Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%. *Cancer Res.* 2002; 62:3789-93.
- 63 Nakajima S, Doi R, Toyoda E et al. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:4125-33.
- 64 Natalwala A, Spychal R, Tselepis C. Epithelial-mesenchymal transition mediated tumorigenesis in the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol.* 2008; 14:3792-7.
- 65 Nelson DA, Tan T, Rabson AB, Anderson D, Degenhardt K, White E. Hypoxia and defective apoptosis drive genomic instability and tumorigenesis. *Genes Dev.* 2004; 18:2095-107.
- 66 Newton JL, Allen A, Westley BR, May FE. The human trefoil peptide, TFF1, is present in different molecular forms that are intimately associated with mucus in normal stomach. *Gut.* 2000; 46:312-20.

- 67 Nothlings U, Murphy SP, Wilkens LR, Henderson BE, Kolonel LN. Dietary glycemic load, added sugars, and carbohydrates as risk factors for pancreatic cancer: the Multiethnic Cohort Study. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86:1495-501.
- 68 Nothlings U, Wilkens LR, Murphy SP, Hankin JH, Henderson BE, Kolonel LN. Body mass index and physical activity as risk factors for pancreatic cancer: the Multiethnic Cohort Study. *Cancer Causes Control.* 2007; 18:165-75.
- 69 Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science.* 2009; 324:1457-61.
- 70 Orr RK. Outcomes in pancreatic cancer surgery. *Surg Clin North Am.* 2010; 90:219-34.
- 71 Otto WR, Thim L. Trefoil factor family-interacting proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62:2939-46.
- 72 Park WS, Oh RR, Park JY et al. Somatic mutations of the trefoil factor family 1 gene in gastric cancer. *Gastroenterology.* 2000; 119:691-8.
- 73 Perrais M, Pigny P, Copin M, Aubert J, Van Seuningen I. Induction of MUC2 and MUC5AC mucins by factors of the epidermal growth factor (EGF) family is mediated by EGF receptor/Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase cascade and Sp1. *J Biol Chem.* 2002; 277:32258-67.
- 74 Perry JK, Kannan N, Grandison PM, Mitchell MD, Lobie PE. Are trefoil factors oncogenic? *Trends Endocrinol Metab.* 2008; 19:74-81.
- 75 Playford RJ, Marchbank T, Chinery R et al. Human spasmodic polypeptide is a cytoprotective agent that stimulates cell migration. *Gastroenterology.* 1995; 108:108-16.

- 76 Podolsky DK, Lynch-Devaney K, Stow JL et al. Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J Biol Chem.* 1993; 268:12230.
- 77 Prasad NB, Biankin AV, Fukushima N et al. Gene expression profiles in pancreatic intraepithelial neoplasia reflect the effects of Hedgehog signaling on pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Res.* 2005; 65:1619-26.
- S. 12: Adapted and reprinted by permission from the American Association for Cancer Research: Prasad NB et al. Gene expression profiles in pancreatic intraepithelial neoplasia reflect the effects of Hedgehog signaling on pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Res.* 2005; 65:1619-26.
- 78 Prest SJ, May FEB, Westley BR. The estrogen-regulated protein, TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells. *FASEB J.* 2002; 16:592-4.
- 79 Prud'homme JF, Fridlansky F, Le Cunff M et al. Cloning of a gene expressed in human breast cancer and regulated by estrogen in MCF-7 cells. *DNA.* 1985; 4:11-21.
- 80 Rebours V, Boutron-Ruault M, Schnee M et al. Risk of pancreatic adenocarcinoma in patients with hereditary pancreatitis: a national exhaustive series. *Am J Gastroenterol.* 2008; 103:111-9.
- 81 Reeves EP, Ali T, Leonard P et al. Helicobacter pylori lipopolysaccharide interacts with TFF1 in a pH-dependent manner. *Gastroenterology.* 2008; 135:2043-54, 2054.e1-2.
- 82 Regalo G, Wright NA, Machado JC. Trefoil factors: from ulceration to neoplasia. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62:2910-5.

- 83 Ribieras S, Lefebvre O, Tomasetto C, Rio MC. Mouse Trefoil factor genes: genomic organization, sequences and methylation analyses. *Gene*. 2001; 266:67-75.
- 84 Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Berlin, 2010.
- 85 Robert Koch-Institut (Hrsg.). Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. RKI, Berlin, 2010.
- 86 Rodrigues S, Attoub S, Nguyen Q et al. Selective abrogation of the proinvasive activity of the trefoil peptides pS2 and spasmolytic polypeptide by disruption of the EGF receptor signaling pathways in kidney and colonic cancer cells. *Oncogene*. 2003; 22:4488-97.
- 87 Rodrigues S, Nguyen QD, Faivre S et al. Activation of cellular invasion by trefoil peptides and src is mediated by cyclooxygenase- and thromboxane A2 receptor-dependent signaling pathways. *FASEB J*. 2001; 15:1517-28.
- 88 Rodrigues S, Rodrigue CM, Attoub S et al. Induction of the adenoma-carcinoma progression and Cdc25A-B phosphatases by the trefoil factor TFF1 in human colon epithelial cells. *Oncogene*. 2006; 25:6628-36.
- 89 Rodrigues S, Van Aken E, Van Bocxlaer S et al. Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling. *FASEB J*. 2003; 17:7-16.
- 90 Ruchaud-Sparagano M, Westley BR, May FEB. The trefoil protein TFF1 is bound to MUC5AC in human gastric mucosa. *Cell Mol Life Sci*. 2004; 61:1946-54.

- 91 Sagol O, Tuna B, Coker A et al. Immunohistochemical detection of pS2 protein and heat shock protein-70 in pancreatic adenocarcinomas. Relationship with disease extent and patient survival. *Pathol Res Pract.* 2002; 198:77-84.
- 92 Schutte M, Hruban RH, Geradts J et al. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res.* 1997; 57:3126-30.
- 93 Shi C, Hruban RH, Klein AP. Familial pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2009; 133:365-74.
- 94 Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol.* 1962; 59:223-39.
- 95 Silen W, Ito S. Mechanisms for rapid re-epithelialization of the gastric mucosal surface. *Annu Rev Physiol.* 1985; 47:217-29.
- 96 Simpson JC, Wellenreuther R, Poustka A, Pepperkok R, Wiemann S. Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. *EMBO Rep.* 2000; 1:287-92.
- 97 Singh S, Baker PR, Poulson R et al. Expression of oestrogen receptor and oestrogen-inducible genes in pancreatic cancer. *Br J Surg.* 1997; 84:1085-9.
- 98 Su GH, Hruban RH, Bansal RK et al. Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers. *Am J Pathol.* 1999; 154:1835-40.
- 99 Takaori K, Hruban RH, Maitra A, Tanigawa N. Pancreatic intraepithelial neoplasia. *Pancreas.* 2004; 28:257-62.

- 100 Tan X, Egami H, Nozawa F, Abe M, Baba H. Analysis of the invasion-metastasis mechanism in pancreatic cancer: involvement of plasmin(ogen) cascade proteins in the invasion of pancreatic cancer cells. *Int J Oncol.* 2006; 28:369-74.
- 101 Taupin D, Wu DC, Jeon WK, Devaney K, Wang TC, Podolsky DK. The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes: EGF receptor- and MAP kinase-dependent interregulation. *J Clin Invest.* 1999; 103:R31-8.
- 102 Taupin DR, Kinoshita K, Podolsky DK. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:799-804.
- 103 Terris B, Blaveri E, Crnogorac-Jurcevic T et al. Characterization of gene expression profiles in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *Am J Pathol.* 2002; 160:1745-54.
- 104 Thim L, Madsen F, Poulsen SS. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur J Clin Invest.* 2002; 32:519-27.
- 105 Thim L, May FEB. Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62:2956-73.
- 106 Thim L. A new family of growth factor-like peptides. 'Trefoil' disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins). *FEBS Lett.* 1989; 250:85-90.
- 107 Thim L. Trefoil peptides: from structure to function. *Cell Mol Life Sci.* 1997; 53:888-903.
- 108 Tomasetto C, Masson R, Linares JL et al. pS2/TFF1 interacts directly with the VWFC cysteine-rich domains of mucins. *Gastroenterology.* 2000; 118:70-80.

- 109 Tomasetto C, Rio M. Pleiotropic effects of Trefoil Factor 1 deficiency. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62:2916-20.
- 110 Torres L, Karam SM, Wendling C et al. Trefoil factor 1 (TFF1/pS2) deficiency activates the unfolded protein response. *Mol Med.* 2002; 8:273-82.
- 111 Uchino H, Kataoka H, Itoh H, Hamasuna R, Koono M. Overexpression of intestinal trefoil factor in human colon carcinoma cells reduces cellular growth in vitro and in vivo. *Gastroenterology.* 2000; 118:60-9.
- 112 Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009; 324:1029-33.
- 113 Vrieling A, Bueno-de-Mesquita HB, Boshuizen HC et al. Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer.* 2010; 126:2394-403.
- 114 Welter C, Theisinger B, Seitz G et al. Association of the human spasmolytic polypeptide and an estrogen-induced breast cancer protein (pS2) with human pancreatic carcinoma. *Lab Invest.* 1992; 66:187-92.
- 115 Westley BR, Griffin SM, May FEB. Interaction between TFF1, a gastric tumor suppressor trefoil protein, and TFIZ1, a brichos domain-containing protein with homology to SP-C. *Biochemistry.* 2005; 44:7967-75.
- 116 Wong WM, Playford RJ, Wright NA. Peptide gene expression in gastrointestinal mucosal ulceration: ordered sequence or redundancy? *Gut.* 2000; 46:286-92.



- 117 Wright NA, Pike C, Elia G. Induction of a novel epidermal growth factor-secreting cell lineage by mucosal ulceration in human gastrointestinal stem cells. *Nature*. 1990; 343:82-5.
- 118 Wright NA, Pike CM, Elia G. Ulceration induces a novel epidermal growth factor-secreting cell lineage in human gastrointestinal mucosa. *Digestion*. 1990; 46 Suppl 2:125-33.
- 119 Yamamoto H, Itoh F, Iku S et al. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human pancreatic adenocarcinomas: clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression. *J Clin Oncol*. 2001; 19:1118-27.
- 120 Yang JM, Lee J, Southern JF, Warshaw AL, Dhanak E, Lewandrowski KB. Measurement of pS2 protein in pancreatic cyst fluids. Evidence for a potential role of pS2 protein in the pathogenesis of mucinous cystic tumors. *Int J Pancreatol*. 1998; 24:181-6.
- 121 Yeh T, Jan Y, Chiu C et al. Characterisation of oestrogen receptor, progesterone receptor, trefoil factor 1, and epidermal growth factor and its receptor in pancreatic cystic neoplasms and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut*. 2002; 51:712-6.
- 122 Yio X, Diamond M, Zhang J et al. Trefoil factor family-1 mutations enhance gastric cancer cell invasion through distinct signaling pathways. *Gastroenterology*. 2006; 130:1696-706.

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1: Entstehung des Pankreaskarzinoms über die Vorstufen der Pankreatischen Intraepithelialen Neoplasie**

**Abbildung 2: Immunhistochemische Analyse der TFF1-Expression in einer PanIN-1B-Läsion**

**Abbildung 3: Schematische Darstellung des pcDNA/V5-DEST-Vektors (Fa. Invitrogen)**

**Abbildung 4: Schema der Gesichtsfeldauszählung im Soft-Agar-Assay**

**Abbildung 5: Relative Expression von TFF1 in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien**

**Abbildung 6: Western Blot-Analyse der TFF1 Expression**

**Abbildung 7: Schematische Darstellung der GFP-Konstrukte**

**Abbildung 8: Western Blot-Analyse der Expression von TFF1 und den gekoppelten Fluoreszenzproteinen in HEK-293-Zellen**

**Abbildung 9: Transient transfizierte HEK 293 im Fluoreszenzmikroskop**

**Abbildung 10: Quantitative RT-PCR der Expressionsstärke von TFF1 in ausgewählten stabilen Klonen der Zelllinie PaTu 8988t**

**Abbildung 11: MTT-Assay transient transfizierter HEK-293**

**Abbildung 12: Proliferation von TFF1-überexprimierenden HEK-293-Zellen im Cell Proliferation ELISA.**

**Abbildung 13: Proliferation von TFF1-überexprimierenden HEK-293-Zellen im Cell Proliferation ELISA.**

**Abbildung 14: Proliferation von HEK-293 nach Kultivierung in TFF1-haltigem Medium**

**Abbildung 15: Substratunabhängiges Wachstum der TFF1-überexprimierenden HEK-293-Zellen**

**Abbildung 16: Koloniebildung von HEK-293 im Fluoreszenzmikroskop nach 7-tägigem Wachstum**

**Abbildung 17: Proliferation von stabil transfizierten PaTu 8988t im Cell Proliferation ELISA**

**Abbildung 18: Western Blot Analyse der PARP-Spaltung stabil transfizierter PaTu 8988t**

**Abbildung 19: Quantitative RT-PCR nach TFF1-Repression in PaTu 8988s**

**Abbildung 20: Western Blot-Analyse nach TFF1-Repression in PaTu 8988s**

**Abbildung 21: Proliferation von PaTu 8988s bei TFF1-Repression im Cell Proliferation ELISA.**

**Abbildung 22: Western Blot Analyse der PARP-Spaltung transient mit siRNA transfizierter PaTu 8988s**

**Abbildung 23: Relative Anzahl migrierter PaTu 8988s-Zellen im Transwell-Assay**

## **8.2 Tabellenverzeichnis**

**Tabelle 1: Selektionszusätze für die Bakterienkultur**

**Tabelle 2: Ansatz für die Transfektion mit Effectene in der 6-Lochplatte**

**Tabelle 3: Ansatz für die Transfektion mit Lipofectamine 2000 pro well in der 6-Lochplatte**

**Tabelle 4: Verwendete siRNA**

**Tabelle 5: In der Real-time PCR eingesetzte Primer**

**Tabelle 6: Im Western-Blot verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen**

### 8.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro-
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ABTS	Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
AGS	Human gastric adenocarcinoma cell line
AMPUWA	steriles pyrogenfreies Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
BCEI	Breast cancer estrogen inducible
BRCA2	Breast Cancer 2
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	centi-
ca.	circa
CAM	chick chorioallantoic membrane
cdk1/2	cyclin-dependent kinase 1/2
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
CFP	Cyan Fluorescent Protein
CMV	Cytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase 2
d	destilliert
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

---

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPC4	= SMAD4
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunoabsorbent assay
EMT	Epithelial-Mesenchymale-Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERE	Estrogene response elements
et al.	et alias
Fa.	Firma
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FGF (-2)	Fibroblastic Growth Factor (2)
for	forward
g	Gramm
G1-Phase	gap 1-Phase
GFP	Green Fluorescent Protein
GH	Growth Hormone
GNK2	Gastrokin 2
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure
HCT116	humane Kolonkarzinomzelllinie
HCT8/S11	humane Kolonkarzinomzelllinie

---

HEK-293	Human embryonic kidney cell line
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HRP	Horseradish peroxidase
HSP70	Heat Shock Protein 70
HT29	human colon adenocarcinoma cell line
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IEC18	Dünndarm-Zelllinie aus der Ratte
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like Growth Factor
IMIM PC 1/2	humane Pankreaskarzinomzelllinie
IPMN	Intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie
ITF	Intestinal Trefoil Factor
k	kilo-
KI-67	nukleäres, proliferationsassoziiertes Protein
Ktr.	Kontrolle
l	Liter
LB	Lysogeny Broth
m	milli-
M	Mol
m	Meter
MAPK/ERK	Mitogen-activated proteine kinase
MCF-7	humane Mammakarzinomzelllinie (Adenokarzinom)
MCN	Muzinös zystische Neoplasie
MDA-MB-231	humane Mammakarzinomzelllinie
MDCK	Madin Darby canine kidney, Nierenepithelzelllinie aus dem Hund
Mia PaCa	humane Pankreaskarzinomzelllinie
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

---

MTT	Dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium salt
MUC2	Muzin 2
MUC5AC	Muzin 5AC
n	nano-
NC-Membran	Nitrozellulose-Membran
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
P16	Protein 16
p16INK4	Protein 16
p21CIP1/Waf1	Protein 21
p53	Protein 53
Panc	humane Pankreaskarzinomzelllinie
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PaTu 8988s/t	humane Pankreaskarzinomzelllinien
PBS	Phosphate-buffered saline
PC/AA/C1	humane prämaligne Kolonadenomzelllinie
PCR	Polymerase Chain Reaction
PET-Membran	Polyethylenterephthalat-Membran
pH	potentia Hydrogenii
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinasen
pRb1	Retinoblastom Protein
PSC	Pancreatic stellate cells
PSCA	Prostate Stem Cell Antigen
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
qRT-PCR	Real time quantitative PCR
rev	reverse
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RNA	Ribonukleinsäure

RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
Rossi	humane Pankreaskarzinomzelllinie
RPLP0	ribosomal protein, large, P0
rpm	rounds per minute
s.	siehe
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
siRNA	small interfering RNA
SMAD4	Mothers against decapentaplegic homolog 4
SP	Spasmolytic Polypeptide
S-Phase	Synthese-Phase
src-1	steroid receptor coactivator 1
STK11	Serine/threonine kinase 11
Suit 007/028	humane Pankreaskarzinomzelllinien
T47D	humane Mammakarzinomzelllinie (mit p53-Mutante)
TBS	Tris-buffered Saline
TBST	Tris-buffered Saline Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFF1/2/3	Trefoil Factor 1/2/3
TFIZ1	Trefoil Factor Interactions(z)1
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TopoII $\alpha$	Topoisomerase II $\alpha$
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
Tris	Tris-hydroxy-methyl-aminomethan
Triton X 100	Alkylphenylpolyethylenglykol
Tween 20	Polyoxymethylensorbitan-monolaurat
UACL	Ulcer associated cell lineage



UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
YFP	Yellow Fluorescent Protein
z. B.	zum Beispiel

## 8.4 Verzeichnis akademischer Lehrer

Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Bastians, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Benes, Berger, Bette, Bolm, Braun, Brehm, Büch, Buchholz, Burbelko, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Del Rey, Dietrich, Dinges, Dominguez, Donner-Banzhoff, Duda, Eberhard, Eilers, Ellenrieder, Elsässer, Egenhart-Cabillic, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Funck, Geks, Gerdes, Görg, Gress, Grimm, Grundmann, Gudermann, Hadij, Hasilik, Hegele, Hertl, Herzum, Höffken, Hörle, Hofmann, Hoyer, Jacob, Jaques, Kalder , Kalinowski, Kann, Kanngießer, Käuser, Kill, Klenk, Klose, Köhler, Koolmann, Krieg, Kroh, Kuhlmann, Langer, Lemke, Leonhardt, Lill, Liß, Löffler, Löser, Lohoff, Maier, Maisch, Michl, Mittag, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Pagenstecher, Printz, Ramaswamy, Renz, Richter, Rolfes, Rominger, Röper, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schlosser, Schmidt, Schnabel, Schneider, Schofer, Seitz, Sesterhenn, Steinkamp, Steiniger, Suske, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Waldegger, Weihe, Werner, Westermann, Wollmer, Wündisch, Wulf

## **8.5 Danksagung**

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Gress für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut anzufertigen.

Ein ganz besonderer Dank an PD Dr. Malte Buchholz für die Überlassung des Themas sowie die großartige Betreuung.

Der Arbeitsgruppe danke ich für die angenehme Atmosphäre und die liebe Unterstützung. Danke auch an alle übrigen Labormitarbeiter.

Weiterhin gilt mein herzlicher Dank allen, die moralisch und praktisch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Danke!